UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
OCT 27'54

EXPERIENTIA

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA · J. WEIGLE
Lausanne Bern Zürich Genève-Pasadena
Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

VERLAG BIRKHÄUSER AG · BASEL 10
SUISSE — SCHWEIZ — SVIZZERA — SWITZERLAND

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

H. Gams: Neue Beiträge zur Vegetations- und Klimageschichte der nord- und mitteleuropäischen Interglaziale 357

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

R. Kurth: Das mittlere Molekulargewicht der Sternmaterie 363
L. Courvoisier: Über die «absoluten» Bewegungen der Milchstrasse und der nächsten Spiralnebel 364
M. Bossolasco: Schneefall und Lufttemperatur 365
H. Huttenlocher, Th. Hügi und W. Nowacki: Röntgenographische und spektrographische Untersuchungen am Bazzit vom Val Strem (Kt. Graubünden) 366
M. Frankel and R. Wolovsky: Separation of *Cis*- and *Trans*-Azobenzene by Chromatography on Paper 367
C. A. Grob und O. Schindler: Versuche zur Synthese von Verbindungen der Steroidreihe 367
F. S. Sjöstrand and V. Hanzon: Electron Microscopy of the Golgi Apparatus of the Exocrine Pancreas Cells 367
F. S. Sjöstrand and Ebba Andersson: Electron Microscopy of the Intercalated Discs of Cardiac Muscle Tissue 369
J. Meyer-Arendt und M. Bayer: Absorptionsspektrum von Melaninpigment 371
V. Caglioti, A. Ascenzi, and M. Scrocco: Infrared Spectrometric Research on the Relation Between Ossein and Inorganic Bone Fraction 371
S. Čmelik: Lipoide und Virulenz bei Typhusbakterien 372
M. Vajda und T. Nógrádi: Komplex-Stabilität und tuberkulostatische Aktivität einiger 8-Oxychinolinderivate 373
P. Baudet et G. Hagemann: Purification de la pénicillinase de *Bacillus cereus* 374
R. Meier und B. Schär: Spezifische Wirkung einiger tierischer und bakterieller Polysaccharide auf Leucocyten *in vitro* 376
A. Sarachek: X-Ray Inactivation of Saccharomyces During the Budding Cycle 377
E. C. Grob, Verena Grundbacher und W. H. Schopfer: Der Einfluss der Pantothensäure, des Pantethins und des phosphorylierten Pantethins auf die Carotinbildung bei *Mucor hiemalis* 378
S. Lissitzky, Isabelle Garcia et J. Roche: Sur la caractérisation de dérivés guanidiques d'origine biologique par électrophorèse et chromatographie sur papier (chromatoélectrophorèse) 379
S. Perugini: Sul significato dell'affinità dei granuli neutrofili dei leucociti per i coloranti tipo Sudan 381
K. N. Saxena: Feeding Habits and Physiology of Digestion of Certain Leafhoppers Homoptera: Jassidae 383
A. P. de Groot and St. Voogd: On the Ovary Development in Queenless Workers Bees (*Apis mellifica* L.) 384
O. Kuhn und J. Kähling: Augenrückbildung und Lichtsinn bei *Anoptichthys jordani* Hubbs und Innes 385
V. Tomberg: Über eine neue Methode der Messung sehr kleiner Mengen von CO in Luft, Blut und Lunge (Pro Laboratorio) 388
W. Keup: Zentrifugenfiltration mit hohen Drucken (Pro Laboratorio) 389

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Planen und Auswerten von Versuchen. Von Arthur Linder (Verlag Birkhäuser AG., Basel und Stuttgart 1953) (Ref. H. Borth) 391

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

Studiorum progressus: H. Boström and E. Jorpes: On the Enzymatic Exchange of the Sulphate Group of the Animal Sulpho-Mucopolysaccharides 392

EXPERIENTIA

L'EXPERIENTIA publiera:

1. des *articles originaux* sur les récentes recherches scientifiques écrits dans une des langues principales;
2. de *brèves communications;*
3. informera ses lecteurs des événements marquants de la vie scientifique, donnera des *comptes rendus concernant les récentes publications, les congrès et les assemblées.*

Die EXPERIENTIA stellt sich die Aufgabe:

1. durch *zusammenfassende Originalartikel* in einer der wissenschaftlichen Hauptsprachen von Autoren aus verschiedenen Ländern über Forschungsergebnisse berichten zu lassen, die im Vordergrund des Interesses stehen;
2. kurze *Mitteilungen* aufzunehmen;
3. durch Besprechung neuerschienener *Bücher*, durch Referate über *Kongresse* und *Versammlungen* sowie durch andere Mitteilungen über die bedeutendsten Ereignisse des naturwissenschaftlichen Lebens zu informieren.

EXPERIENTIA si propone di pubblicare:

1. *articoli originali riassuntivi,* in una delle principali lingue usate dalla scienza, ad opera di autori di diversi paesi, su risultati scientifici di grande interesse;
2. *brevi comunicazioni;*
3. *recensioni di nuovi libri, relazioni di congressi e riunioni,* come pure altre comunicazioni su importanti avvenimenti nel campo delle scienze naturali.

The aim of EXPERIENTIA is:

1. to publish comprehensive articles embodying the results of recent scientific research. These will be written in one of the principal scientific languages and contributed by authors in various countries;
2. to publish *brief reports;*
3. to give information about the most important events in natural science by means of *reviews of the latest books, reports on congresses and meetings,* as well as through other communications.

E X P E R.

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 32.– pour la Suisse; pour l'étranger fr. 38.–. Ces prix s'entendent en francs suisses.
Adresser toute correspondance touchant la rédaction de l'EXPERIENTIA exclusivement à l'éditeur soussigné.
Dernier délai d'admission pour les manuscrits: 2 mois avant la parution. Les auteurs recevront gratuitement, s'ils le désirent, 50 tirés à part de format 14,5 sur 21 cm, sans couverture. Pour le prix d'un nombre plus grand et pour la couverture s'adresser à l'éditeur. Les tirages à part doivent être commandés *avant* l'impression du périodique.
Prix pour les annonces: $^1/_1$ page fr. 220.–, ½ page fr. 132.–, ¼ page fr. 77.–. Placements spéciaux: prix sur demande. Demandes à l'éditeur.
L'EXPERIENTIA est imprimée en Suisse.

Editions Birkhäuser S.A., Bâle 10 (Suisse), Elisabethenstrasse 15
Tél. 249800; adresse télégraphique: Edita Bâle

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Auslande durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. In Algerien, Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Italien, Luxemburg, Marokko, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden nehmen auch die Postämter Bestellungen entgegen. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 32.–, im Ausland sFr. 38.–.
Alle Zuschriften an die Redaktion sind ausschliesslich an den Verlag zu richten. Redaktionsschluss 2 Monate vor Erscheinungsdatum.
Die Autoren erhalten auf Wunsch 50 Gratisseparata im Format 14,5 × 21 cm, ohne Umschlag. Die Kosten für weitere Separata und für Umschläge sind beim Verlag zu erfragen. Separata sind *vor* dem Druck der Zeitschrift zu bestellen.
Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, ½ Seite Fr. 132.–, ¼ Seite Fr. 77.–; für Vorzugsseiten besondere Vereinbarung. Inseratenannahme durch den Verlag.
Die EXPERIENTIA wird in der Schweiz gedruckt.

Verlag Birkhäuser AG., Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 15
Tel. 249800; Telegrammadresse: Edita Basel

ESPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 32.– per la Svizzera; all'estero fr. 38.–. I prezzi vanno intesi valuta svizzera.
Tutti gli invii alla redazione di EXPERIENTIA vanno indirizzati esclusivamente alla sottoindicata casa editrice.
La redazione di ogni fascicolo si chiude 2 mesi prima della pubblicazione.
Gli autori ricevono, su desiderio, 50 estratti del formato 14,5 × 21 cm, senza copertina. Il prezzo degli estratti in più e della copertina viene indicato, su richiesta, dalla casa editrice. Gli estratti vanno ordinati *prima* della stampa della Rivista.
Prezzi per annunci: $^1/_1$ pag. fr. 220.–, ½ pag. fr. 132.–, ¼ pag. fr. 77.–; per pagine speciali, accordi da stabilire. Gli annunci sono da inviare alla casa editrice.
EXPERIENTIA si stampa in Isvizzera.

Casa editrice Birkhäuser S.A., Basilea 10 (Svizzera), Elisabethenstr. 15
Tel. 249800; Indirizzo telegrammi: Edita Basilea

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The annual subscription price by inland mail is fr. 32.–; other countries fr. 38.–. Prices in Swiss currency. All communications to the editors should be addressed to the publishers. All manuscripts for publication in a given number must be in the hands of the publishers 2 months before the publication.
The authors receive, on request, 50 reprints 14,5 × 21 cm without cover free of charge. For the prices of additional reprints and covers, inquiries should be addressed to the publishers. Reprints must be ordered *before* the number is printed.
Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, ½ page fr. 132.–, ¼ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

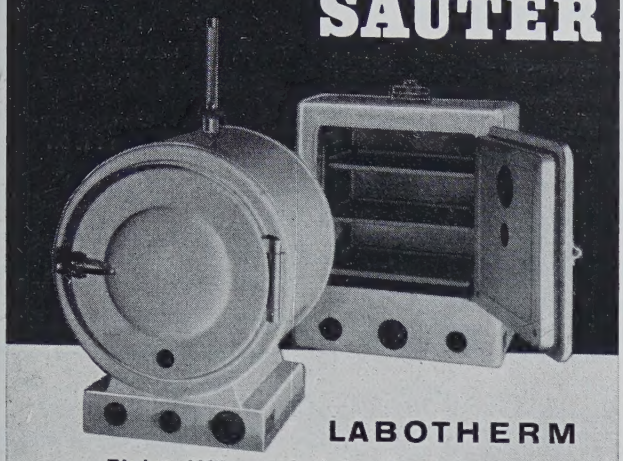
Published by Birkhäuser Ltd., Basle 10 (Switzerland), Elisabethenstr. 15
Phone 249800; Telegrams: Edita Basle

Printed in Switzerland / E. Birkhäuser & Cie., Basel

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia X/9

Ciba AG., Basel
Ganz & Co., Zürich
J. R. Geigy AG., Basel
E. Mettler, Zürich
Sandoz AG., Basel
Sauter AG., Basel
Trüb, Täuber, Zürich
Verlag Birkhäuser, Basel
Verlag Chemie, Weinheim
VEB, Zeiss, Jena

SAUTER



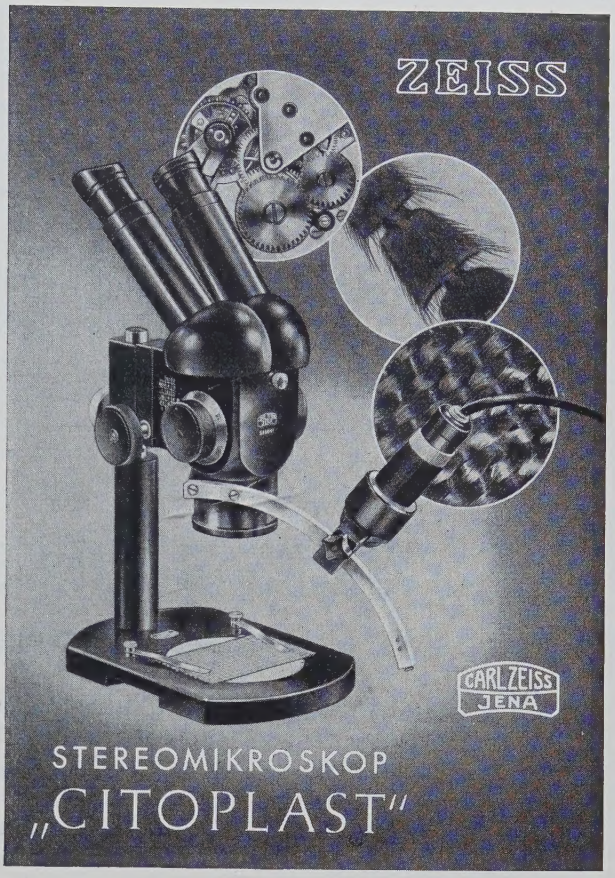
LABOTHERM

Elektr. Wärmeschränke für Laboratorien

Prüfschränke für Farben und Lacke
Härteprüfung von Kunststoffen
Dichte - Feuchtigkeit - Säuregehalt-
prüfungen, Vorwärmung u.s.w.
Trockenschränke, Sterilisatoren
Brut- und Labschränke, Vakuumschränke

FR. SAUTER A.G.,
FABRIK ELEKTRISCHER APPARATE, BASEL

ZEISS



STEREOMIKROSKOP
„CITOPLAST"

Anfragen unter 30/P1 «CIT» erbeten
VEB CARL ZEISS JENA

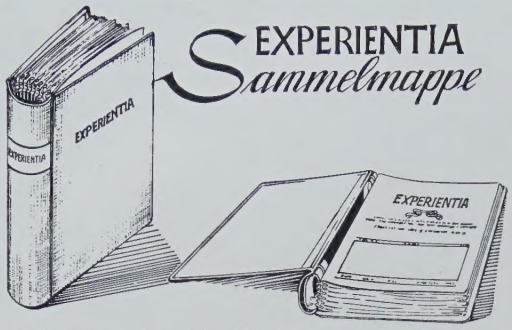
für den Erfolg entscheidend

ist die moderne Ausrüstung Ihres Laboratoriums. Dazu gehört in erster Linie die METTLER Analysenwaage. Wegen ihrer Genauigkeit und einfachen Bedienung ist sie auf der ganzen Welt zum Begriff geworden. Verlangen Sie bitte eine unverbindliche Demonstration.

Mettler ANALYSENWAAGE

E. METTLER ZÜRICH 1 SCHWEIZ PELIKANSTR. 19 TEL. (051) 25 25 70

*



EXPERIENTIA
Sammelmappe

Preis, in Kunstleder gebunden: Fr. 6.75

Diese Mappe hat den Zweck, die Hefte des laufenden Jahrganges zusammenzuhalten, bevor der komplette Jahrgang gebunden werden kann. Die einzelnen Hefte können mittels einer neuartigen, patentierten Haltevorrichtung in die Mappe eingeheftet und im Bedarfsfall wieder herausgelöst werden. Mit dieser geschmackvoll in Kunstleder gebundenen Mappe soll dem Übelstand abgeholfen werden, daß einzelne Hefte im Laufe des Jahres verlorengehen und vor dem Einbinden nachbezogen werden müssen. Die Sammelmappe ist so massiv konstruiert, dass sie ihren Dienst auf Jahre hinaus leisten wird.

BESTELLSCHEIN

An den
VERLAG BIRKHÄUSER AG.
BASEL 10 (Schweiz)

Ich bestelle ... Sammelmappe(n) zum Preise von Fr. 6.75

Name: _____

Vorname: _____

Ort: _____

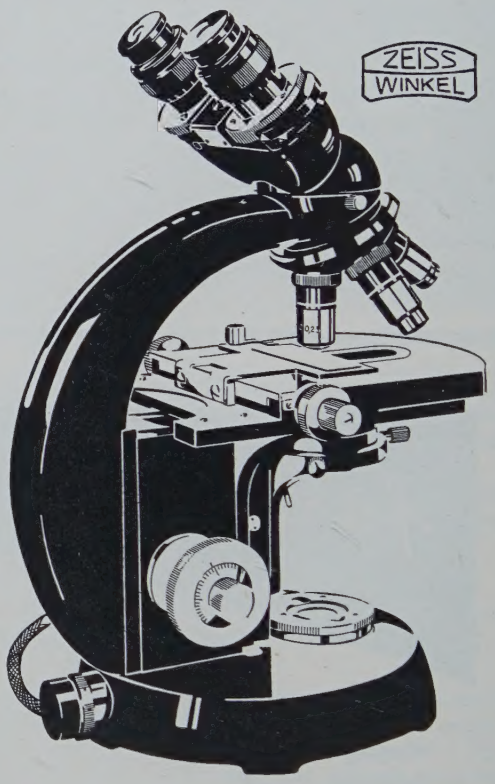
Strasse: _____

Bitte in Blockschrift schreiben

NEUES **ZEISS**-WINKEL STANDARD-MIKROSKOP GF 625

Das Ergebnis einer hundertjährigen Tradition !

- **Lichtstarke Einbaubeleuchtung (Köhlersches Prinzip) für subjektive Beobachtung und Mikrophotographie**
- **Tiefliegende, koaxial gelagerte Triebknöpfe für Grob- und Feineinstellung**
- **Grosser Kreuztisch mit koaxial gelagerten, links- und rechtsseitig angebrachten Triebknöpfen**
- **Vollkommener Präparatschutz durch gefederte Fassung der Objektive**
- **Vergrösserungswechsler für die Okulare (ohne Okularwechsel)**
- **Schlittenrevolver für fünf Objektive**
- **Vereinigter Hellfeld-Phasenkontrast-Dunkelfeld-Kondensor**
- **Neue Achromate und Neofluare mit dezimalgeometrischer Abstufung der Vergrösserungen**



Auskunft und Vorführung durch die Generalvertretung für die Schweiz:

Verlangen Sie bitte Prospekt Nr. ZW/502/E

GANZ & Co
BAHNHOFSTR. 40
TEL(051) 23 97 73
Zürich

Elektronenmikroskope
Mikrotome
Elektronendiffraktographen
Hochspannungsoszillographen

Trüb, Täuber · Zürich

EXPERIENTIA

Vol. X - Fasc. 9 Pag. 357–396 15. IX. 1954

Neue Beiträge zur Vegetations- und Klimageschichte der nord- und mitteleuropäischen Interglaziale

Von H. GAMS, Innsbruck[1]

Die Bedeutung der Paläobotanik und insbesondere der pflanzlichen Mikrofossilien für die Stratigraphie und Gliederung des Kaenozoikums wird immer noch zu wenig gewürdigt. Dem folgenden Bericht über einige neue Fortschritte schicke ich einige grundsätzliche Bemerkungen voraus.

Vom Standpunkt der gesamten Erd- und Lebensgeschichte haben diejenigen Forscher[2] recht, welche die herkömmliche Gliederung in Tertiär und Quartär und innerhalb dieses in Pleistozän oder Diluvium und Holozän oder Alluvium ganz aufgeben und das ganze Quartär mit dem jüngeren Tertiär als Neogen dem älteren Tertiär oder Paläogen gegenüberstellen wollen. Vom Standpunkt der Menschheits- und Haustiergeschichte wird man jedoch auch weiterhin die bis 1948 sehr verschieden vorgenommene Trennung in Jungtertiär und Quartär und in Eiszeitalter oder Pleistozän und Holozän beibehalten und dieses weiter in Spätglazial und Postglazial gliedern, obgleich das Postglazial weder länger noch wärmer als mindestens 3 Interglaziale des Pleistozäns ist. Auch die beim Quartärkongress von 1932 vereinbarte Gliederung des Pleistozäns in Alt-, Mittel- und Jungpleistozän und des Postglazials im engeren Sinn in Wärmezeit (Neothermal nach ANTEVS) und Nachwärmezeit wird immer ihre Berechtigung behalten. Mit der Annäherung an die «Geschichtliche Zeit» und Gegenwart schwillt ja die Zahl der erhalten gebliebenen und untersuchten fossilführenden Ablagerungen stark an. Beispielsweise sind in einigen Ländern besonders auf pflanzliche Mikrofossilien Ablagerungen aus verschiedenen Zeiten untersucht:

	Altpleistozän (Günz bis Mindel)	Mittelpleistozän		Jung-Pleistozän Würm-Spätglazial
		älteres	jüngeres	
Im Alpengebiet . . .	1 (Leffe)	2–3	etwa25	etwa35
In Holland	3–6	4–8	etwa20	etwa30
In Dänemark	2–4	5–6	41	etwa60
In Polen	1 (Mizerna)	11	17	etwa70
Im europäischen Russl.	2–3	4	etwa50	über60

[1] Botanisches Institut der Universität Innsbruck.

[2] R. F. FLINT, *Glacial Geology and the Pleistocene Epoch* (New York 1947), 598 p.; Eiszeitalter und Gegenwart *3*, 5 (1953).

Eine allgemeingültige Abgrenzung dieser wie auch aller vorangegangenen Zeitabschnitte lässt sich nicht auf fazieller oder geomorphologischer, sondern nur auf paläontologischer Grundlage durchführen.

Seit den ersten, noch sehr unvollständigen Pollenanalysen interglazialer Ablagerungen (C. A. WEBER 1893–1904, HARTZ und STOLLER 1908–1911, GAMS und RYTZ 1918 u.a.) und den ersten Pollendiagrammen solcher, die in den Jahren 1928–1933 von den Niederlanden und Dänemark bis zu den Alpen und bis Russland veröffentlicht worden sind[1], ist deren Zahl vor allem in Nord-, aber auch in Mittel- und Osteuropa so angewachsen und die Untersuchungstechnik und Diagnostik so verfeinert worden, dass wir heute die Floren-, Vegetations- und Klimageschichte von den Britischen Inseln bis zum Ural und von Dänemark bis zu den Südalpen wesentlich besser kennen und auf Grund der Floren und Faunen vor allem die Interglaziale mit bedeutend grösserer Wahrscheinlichkeit parallelisieren und auch datieren können.

Festzustellen ist dabei zuerst, dass in keinem der europäischen, asiatischen und amerikanischen Vereisungsgebiete mehr als 3 wirklich warme Interglaziale und dazu noch 4–5 kühlere Aperzeiten von mehr interstadialem Charakter gefunden werden konnten und somit die Annahme von 9–14 Eiszeiten, die einige Geomorphologen vertreten, nicht zu Recht besteht. Während für die pleistozänen Eiszeiten die von PENCK und BRÜCKNER für die Alpen eingeführten Namen Günz, Mindel, Riss und Würm auch ausserhalb der Alpen immer allgemeiner verwendet werden, haben sich für die Interglaziale und Interstadiale erst wenige Namen allgemein eingebürgert.

Das *Altquartär* bzw. *Altpleistozän* beginnt sowohl nach PENCK und BRÜCKNER wie nach den Beschlüssen der Quartärkonferenz von 1932 und der Geologenkongresse von 1948 und 1952 mit einer starken, auch in den nie vergletscherten extratropischen Gebieten erkennbaren Abkühlung, infolge welcher der Bestand an *exotischen*, das heisst seither ausgestorbenen oder

[1] H. GAMS, Z. Gletscherk. *18*, 279 (1930); Eclog. Geol. Helv. *28*, 1 (1935); Int. Rev. Hydrobiol. und Hydrogr. *35*, 611 (1937); Quartär *1*, 75 (1938); Geol. Bavar. *19*, 364 (1953). – W. P. GRITSCHUK, Transact. Inst. Geogr. Acad. Sci. USSR. *37*, 249 (1946); *46*, 6 (1950).

doch aus der ganzen weiteren Umgebung (Kontinent bzw. Floren- und Faunenreich) verschwundenen Arten sowohl in den nordeuropäischen Meeresfaunen wie in den europäischen Landfloren auf unter $^1/_4$ des gesamten Artenbestandes absinkt. Gleichzeitig erscheinen in Europa zusammen mit den ersten echten Elefanten und Kamelen auch die ersten Vertreter der echten Hirsche, Rinder, Pferde, Hunde usw. und in Nordafrika die ersten Spuren menschlicher Tätigkeit («Sphaeroide» der «Pebble-Kultur»).

Im Mittelpleistozän sinkt der Anteil der Exoten, insbesondere der seither aus Europa verschwundenen «Tertiärarten» in den europäischen Landfloren auf unter $^1/_{10}$, und im *Jungpleistozän* werden sie durch die heute vorherrschenden holarktischen Floren- und Faunenelemente ganz zurückgedrängt, im *Holozän* unter rasch zunehmender Beteiligung der sich ausbreitenden Menschen und ihrer Haustiere, zuletzt einige aus Ostasien und Amerika wieder eingeführt.

Aus der Fülle der heute aus allen nord- und mitteleuropäischen, mehreren süd- und osteuropäischen und auch aussereuropäischen Ländern vorliegenden Pollendiagramme greife ich 7 für die nord- und mitteleuropäische Vegetations- und Klimageschichte besonders bezeichnende Beispiele heraus und gebe sie in gegenüber den Originalarbeiten vereinheitlichter und etwas vereinfachter Form wieder. Um auch bei stärkerer Verkleinerung wesentliche Merkmale, wie den Anteil «exotischer» Gattungen, deutlich hervortreten zu lassen, wähle ich statt der üblichen, besonders für Postglazialprofile bestbewährten Kurvendarstellung des prozentuellen Anteils der Pollengattungen die heute besonders in den angloamerikanischen Arbeiten übliche Flächendarstellung.

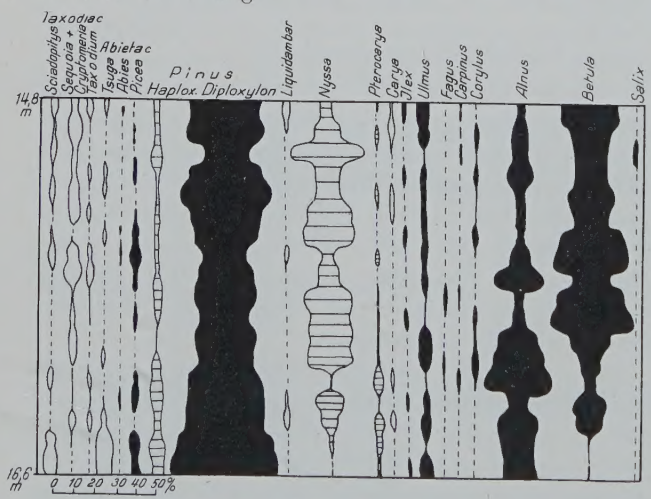


Fig. 1*a*. Pollendiagramm aus dem Oberpliozän (Reuverien) von Belfeld in Südholland (nach Florschütz 1953[1]).

Auch die neuesten Veröffentlichungen aus Holland[1] (siehe Fig. 1 *a* und *b*) und Polen (siehe Fig. 3) bestätigen, dass eine grosse Zahl von Familien und Gattungen, wie *Ginkgo*, die Koniferen *Sequoia, Taxodium, Podocarpus, Libocedrus* u. a., die besonders altertümlichen Laubhölzer *Cercidophyllum, Liriodendron, Cinnamomum, Eucommia, Hakea* als letzte Proteazee, alle Ebenales, *Alangium, Stuartia* als letzte Theazee, *Meliosma, Clerodendron* u.a., am Ende des Pliozäns aus Europa verschwunden sind. Der Einfluss der altpleistozänen Eiszeiten (G und M) und ihrer Interstadiale (A und C nach meiner Bezeichnung) auf den Artenbestand war weniger gross als der der folgenden Eiszeiten. Daher konnten sich bis ins erste warme Interglazial (*B*, siehe Fig. 1–3) mindestens vereinzelt die heute auf Ostasien beschränkten Koniferengattungen *Sciadopitys, Glyptostrobus* und *Pseudolarix* und die Laubholzgattungen *Magnolia, Actinidia, Menispermum, Hamamelis, Corylopsis, Liquidambar, Nyssa, Phellodendron* u.a. halten.

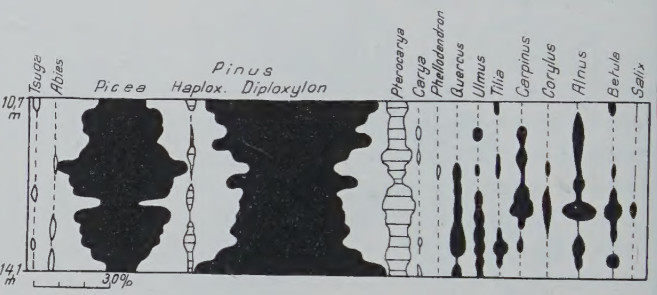


Fig. 1*b*. Pollendiagramm des B-Interglazials (Tiglien) der Grube Russel-Tiglia bei Tegelen in Südholland (nach Florschütz 1953[1]).

Bis in die M-Eiszeit bzw. das höchst wahrscheinlich zwischen ihre beiden Vorstösse fallende, zu Unrecht vielfach für älter (sogar pliozän) oder jünger (*D*) gehaltene C-Interstadial (Cromerien) haben sich in Mitteleuropa gehalten die Koniferengattungen *Pseudotsuga, Keteleeria* und (bis in die Südalpen, siehe Fig. 3) *Cedrus* und die letzten Vertreter der heute auf Nordamerika beschränkten Juglandazeengattungen *Carya* (= *Hicorya*) und *Engelhardtia*; bis in das folgende, sehr viel längere und wärmere D-Interglazial die letzten europäischen Vertreter von *Tsuga* (Hemlock), *Zelcova* (Ulmazee), *Pterocarya* (Flügelnuss) sowie die seither aus Mitteleuropa verschwundene *Tilia tomentosa* (Silberlinde) und die Sumpf- und Wasserpflanzen *Azolla, Euryale* und *Decodon*; bis in das E-Interglazial *Thuja*, die Seerose *Brasenia*, die Cyperazee *Dulichium* und höchst wahrscheinlich auch das seither aus den Alpen und von den Britischen Inseln verschwundene *Rhododendron ponticum*. Ebenso wie innerhalb vieler Säugergattungen (*Elephas, Rhinoceros, Bos, Equus, Ursus* u.a.) hat sich auch innerhalb vieler Pflanzengattungen (*Azolla, Tsuga, Abies, Picea, Pinus, Ulmus, Quercus, Fagus, Betula, Salix, Tilia, Vitis* u.a.) der Artenbestand im Verlauf des Quartärs verändert;

[1] M. van der Vlerk und F. Florschütz, Verh. K. Nederl. Akad. Wet. I *2*, 58 S. (1953).

[1] M. van der Vlerk und F. Florschütz, Verh. K. Nederl. Akad. Wet. I *2*, 58 (1953).

doch konnten bisher nur wenige dieser Leitarten (zum Beispiel Arten von *Azolla, Pinus, Betula*) auch nach Mikrofossilien bestimmt werden.

Auf jeden Fall steht fest, dass die Veränderungen im Artenbestand und in den Mengenverhältnissen

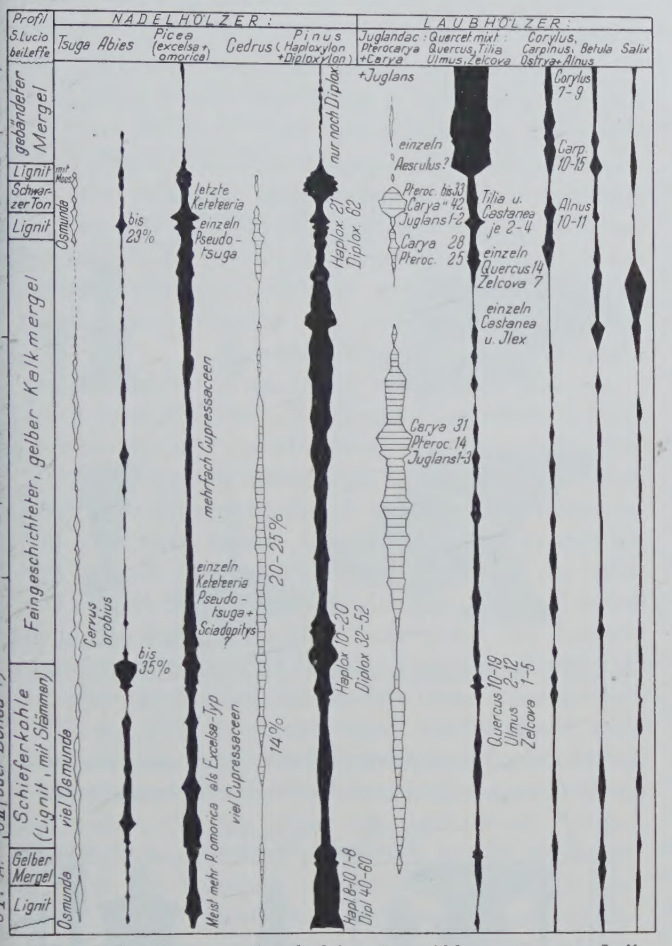


Fig. 2. Pollendiagramm der altpleistozänen Ablagerungen von Leffe bei Bergamo in den Südalpen (nach Lona 1950[1]).

sowohl der Land- wie der Wasserflora so erheblich sind, dass sie nicht nur faziell zur Ermittlung der Vegetationsbedingungen, insbesondere des Klimas, sondern auch stratigraphisch-chronologisch, das heisst zur Unterscheidung der verschiedenen Interglaziale und Interstadiale ausgewertet werden können.

Eine Vergleichung der schon recht zahlreichen Pollendiagramme aus Holland (siehe Fig. 1*a* und *b*, 4, 5), Norddeutschland[2] (Fig. 7), Dänemark[3] (siehe Fig. 6), dem Alpengebiet[1] (siehe Fig. 2), dem Sudeten- und Karpatengebiet (siehe Fig. 3)[2] usw. ergibt für jedes Interglazial charakteristische Züge.

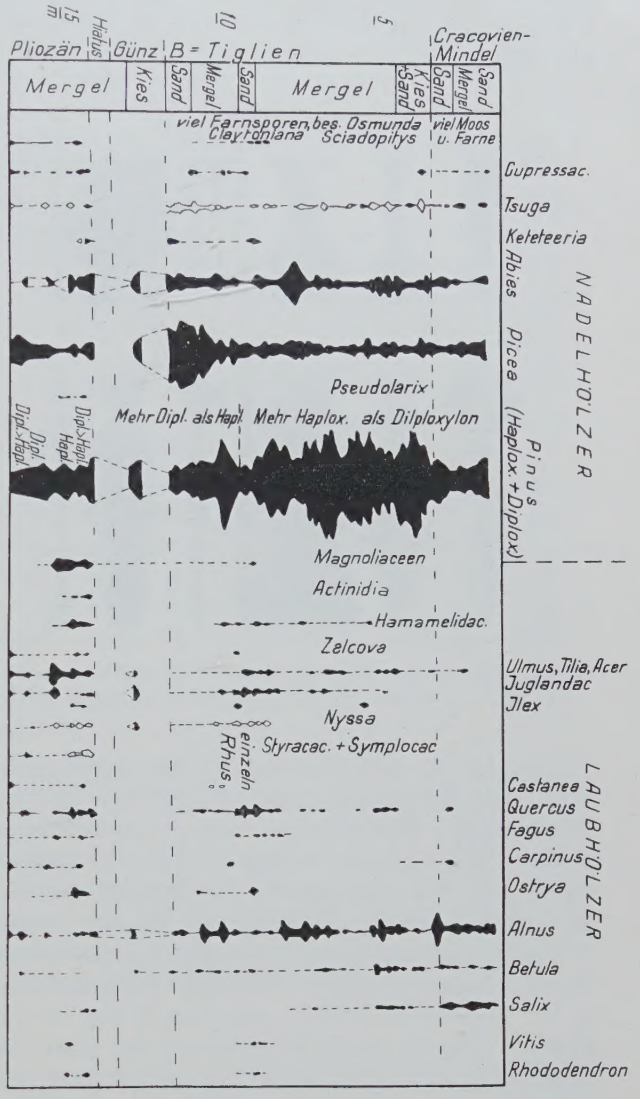


Fig. 3. Pollendiagramm der oberpliozänen und altpleistozänen Ablagerungen von Mizerna in Südpolen (nach Oszastowna bei Szafer[3]).

Im Oberpliozän und Altquartär dominieren zumeist Koniferen, unter denen neben heute zumeist verschwundenen *Abies*- und *Pinus*-Arten auch Taxodiazeen (*Sciadopitys, Sequoia, Taxodium* u.a.), *Tsuga, Keteleeria* u.a. vertreten und auch die Gattungen und Arten der Laubhölzer viel zahlreicher als später waren. Während die Ebenazeen, Styracazeen u.a. am Beginn des Quartärs verschwinden, halten sich mehrere Magnoliazeen, Hamamelidazeen, *Zelcova, Nyssa* und namentlich mehrere Juglandazeengattungen noch das Altquartär hindurch, so dass damals in Europa ähn-

[1] F. Lona, Atti Soc. ital. Sci. nat. *89*, 123 (1950). – S. Venzo, Atti Soc. ital. Sci. Nat. *88*, 79 (1949) und *89*, 43 (1950); Geol. Rundschau *40*, 109 (1952); Geol. Bavar. *19*, 74 (1953).

[2] P. Stark, F. Firbas und F. Overbeck, Abh. Nat. Ver. Bremen *28*, 105 (1932). – W. Selle, Jb. Reichsst. Bodenforsch. *60*, 197 (1941); Eiszeitalter und Gegenwart *2*, 112 (1952). – P. Woldstedt, Z. D. Geol. Ges. *99*, 96 (1947); Eiszeitalter und Gegenw. *3*, 14 (1953). – P. Woldstedt, U. Rein und W. Selle, Eiszeitalter und Gegenw. *1*, 84 (1951). – W. Selle, *Gesetzmässigkeiten im pleistozänen und holozänen Klimaablauf*, Abh. Nat. Verh. Bremen *33*, 259 (1953). – K. Pike und H. Godwin in Quart. J. Geol. Soc. London *108*, 261 (1953).

[3] K. Jessen und V. Milthers, Danmarks Geol. Unders. II *48*, 380 S., 40 Taf. (1928).

[1] W. Lüdi, Veröff. Geobot. Inst. Rübel *27*, 208 (1953). – H. Reich, Flora oder Allg. Bot. Ztg. *140*, 386 (1953). – F. Firbas und P. Zangheri in Nachr. Akad. Göttingen IIb *1954*, p. 11.

[2] B. Zolyomi, Acta Biol. Acad. Sci. Hungar. *4*, 367 (1953).

[3] W. Szafer, Ann. Soc. géol. Pologne *22*, 1 (1953).

liche Nuss-Mischwälder wie heute in gewissen Gegenden Nordamerikas und Mittelasiens bestanden haben müssen, wogegen die Fagazeen und Betulazeen, das heisst die Dominanten der heutigen Laubwälder, ihre Vorherrschaft erst im D-Interglazial, das heisst mit dem Mittelquartär antreten.

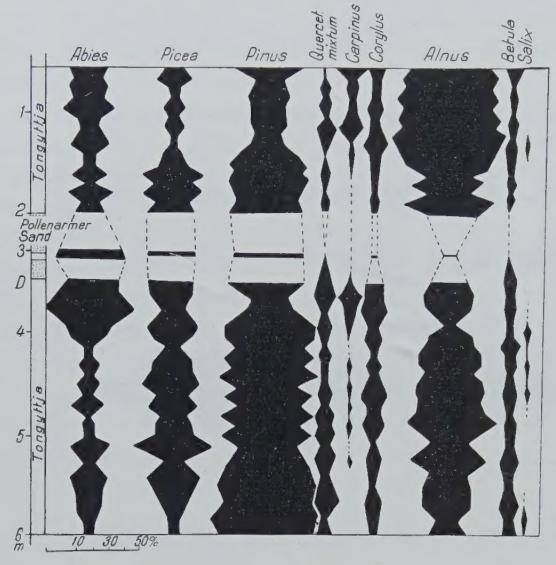


Fig. 4. Pollendiagramm des D-Interglazials (Needien) der Tongrube Ten Bokkel Wuinink bei Neede in Holland (nach Florschütz[1]).

Sowohl die Säugerfauna wie das Pollendiagramm von Leffe in den Bergamaskeralpen (Fig. 2) sprechen entschieden gegen die von Venzo[2] und Lona vertretene Ansicht, dass erst die beiden oberen der dortigen Lignit- oder Schieferkohlenflöze der Günz-Eiszeit und die unteren einer mehrgliedrigen älteren Eiszeit (Donau-Eiszeit nach Eberl) entsprechen. Der Mergel zwischen beiden Eiszeiten enthält eine Flora und Fauna, die durchaus der von Tegelen (B, siehe Fig. 1 *b*) und Mizerna (Fig. 3) entspricht, wogegen der obere, für G–M (B) gehaltene Mergel mit seiner plötzlich einsetzenden Vorherrschaft des Eichenmischwalds nur D-interglazial, somit der noch jüngere Ferretto nicht M-, sondern nur R-, bzw. E-zeitlich sein kann. Auch die angebliche M-Moräne unter der Höttinger Brekzie dürfte eher R-zeitlich sein.

Das Klima der ersten Eiszeiten bis PW (vielleicht mit Ausnahme von M1) war sowohl nach den Pollendiagrammen wie nach den Faunen weniger kalt und kontinental als das der W-Eiszeit, deren weniger ausgedehnte Vergletscherung durch die Niederschlagsarmut ihres Kontinentalklimas zu erklären ist.

Das nach dem Cromer Foresbed benannte Cromerien (C) hat sowohl nach dem Pollendiagramm[3] durchaus interstadialen und nicht interglazialen oder gar präglazialen Charakter und ist wohl mit dem schwarzen Ton im oberen Teil des Profils von Leffe und den Maurer Sanden bei Heidelberg gleichaltrig.

Negative Merkmale aller Interglaziale und Interstadiale von A bis D sind das Fehlen oder die Seltenheit von *Fagus* und das Fehlen so hoher Maxima der *Corylus*-Kurve, wie sie für die ersten Abschnitte des E-Interglazials (Fig. 6 und 7) und der postglazialen Wärmezeit so bezeichnend sind. Vielleicht war die Hasel vor dem E-Interglazial noch nicht durch frühblühende, sich rasch ausbreitende Sträucher, sondern nur durch Bäume vertreten. Ein positiver Unterschied des B- und D-Interglazials gegenüber allen späteren Warmzeiten ist die viel grössere Länge ihrer Warmzeiten, die anscheinend nur unbedeutende Klimaschwankungen aufgewiesen haben.

Aus dem Alpengebiet liegen mit Ausnahme des in Figur 2 wiedergegebenen Profils von Leffe noch keine Pollendiagramme aus diesen älteren Warmzeiten vor, da die vor längerer Zeit begonnenen Analysen des wohl schönsten und reichsten Interglazialprofils der Alpen bei Pianico-Sellere am Iseosee, dessen Alter noch unsicher ist, noch nicht abgeschlossen sind, die von mir früher für D-Interglazial gehaltenen Ablagerungen von Dürnten und Güntenstall wohl jünger sind und auch die reiche Sammlung Lüdis von Schweizer Interglazialdiagrammen[1] auch nach seiner Auffassung keine so alten Profile enthält. Seine Angabe (S. 179), ich hätte die meisten Schieferkohlen der Schweiz zwischen R I und R II eingereiht, beruht auf einem Missverständnis,

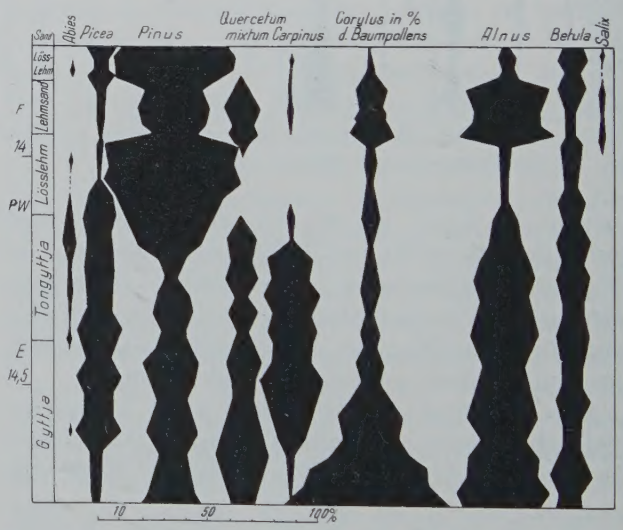


Fig. 5. Pollendiagramm des E- und F-Interglazials von Zwartewater bei Zwolle in Holland (nach Florschütz[2]).

da zwischen den beiden Vorstössen der Riss-Saale-Dnjepr-Eiszeit, deren zweiter den Moränenzug vom

[1] K. Jessen und V. Milthers, Danmarks Geol. Unders. II *48*, 380 S., 40 Taf. (1928).

[2] M. van der Vlerk und F. Florschütz, Verh. K. Nederl. Akad. Wet. I *2*, 58 (1953).

[3] P. W. Thomson bei Woldstedt, *Norddeutschland im Eiszeitalter* (Stuttgart 1950); Eiszeitalter und Gegenwart *1*, 96 (1951).

[1] W. Lüdi, Veröff. Geobot. Inst. Rübel *27*, 208 (1953). – H. Reich, Flora Allg. Bot. Ztg. *140*, 386 (1953).

[2] M. van der Vlerk und F. Florschütz, Verh. K. Nederl. Akad. Wet. I *2*, 58 (1953).

Fläming durch das Warthegebiet bis um Moskau hinterlassen hat, nirgends ein wirklich warmes Interglazial, sondern höchstens ein kürzeres Interstadial nachgewiesen werden konnte (so von KOLUMBE für Hemmoor in Sachsen[1]), das wohl weniger warm als das C-Interstadial der M-Eiszeit gewesen ist. Der RS-II-Vorstoss ist von vielen Autoren mit dem PW-Vorstoss verwechselt worden, dessen Endmoränen anscheinend im Umkreis der Alpen und der nordischen Vereisung auf den meisten Strecken von denen der W-Eiszeit überfahren worden sind.

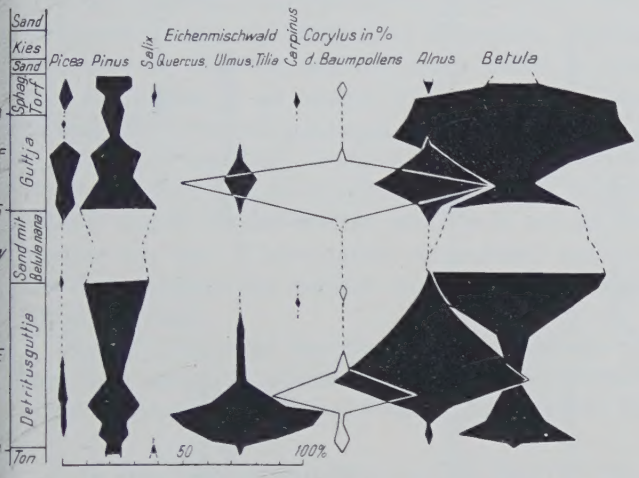


Fig. 6. Pollendiagramm des E- und F-Interglazials von Brörup in Jütland (nach K. JESSEN 1928).

Auf die bis heute sehr umstrittene Frage, welche Ablagerungen dem «*letzten Interglazial*» zuzuschreiben sind, geben die nun schon sehr zahlreichen Pollendiagramme aus Nordeuropa von den Britischen Inseln bis Polen und Russland eine eindeutige Antwort, wogegen aus dem Alpengebiet noch immer nicht genügend viele Untersuchungen vorliegen, um die dortigen Interglaziale mit ähnlicher Sicherheit untereinander und mit den nordischen parallelisieren zu können.

Ein Hauptergebnis ist neben der Feststellung einer sehr ähnlichen Waldentwicklung wie im Postglazial mit ähnlich hohen und kurzdauernden Haselmaxima die zuerst in Dänemark von JESSEN und MILTHERS[2] erkannte *Zweiteiligkeit* des «letzten» Interglazials, das heisst das Vorhandensein einer Glazialphase zwischen einer wärmeren (E) und einer weniger warmen und wohl auch etwas kürzeren Aperzeit (F, siehe Fig. 5 und 6). Dieser Glazialphase entsprechende Moränen (mehr Grund- als Endmoränen, da diese wohl zumeist später überfahren worden sind) sind aus vielen Vereisungsgebieten bekannt, aber meist irrtümlicherweise entweder der RS-Eiszeit bzw. ihrem Warthe-Vorstoss (als Riss III oder «Jung-Riss») oder einem ersten Vorstoss der W-Eiszeit (als Würm I) zugeschrieben worden, so auch früher von mir. Im ersten Fall ist das E-Interglazial entweder als D (Mindel-Riss bzw. Elster-Saale) oder als RS I/II und nur das F-Interglazial als R/W gedeutet worden; im zweiten Fall, den in Anlehnung an BAYER, SOERGEL u.a. auch ich[1] lange vertreten habe, das F-Interglazial als blosses Interstadial der letzten Eiszeit.

Heute scheint es mir am richtigsten, das «letzte Interglazial» in die beiden Interglaziale E (Eemien) und F zu zerlegen und die kurze, sie trennende Kaltzeit als eigene Eiszeit zu bewerten, die am besten als Prae-Würm (PW) bezeichnet wird (s. Tabelle). Dem E-Interglazial entspricht im Norden die Transgression des Eem-Meeres, durch die auch das Ostsee-Gebiet ein noch etwas milderes Klima als in der postglazialen Litorina-Zeit erhalten hat; dem F-Interglazial die Skaerumhede-Serie in Dänemark und der Rixdorfer Horizont bei Berlin. Beide Warmzeiten haben im Gegensatz zum D- und B-Interglazial nur eine einmalige, kurzdauernde Kulmination mit auffallenden Maxima aller wärmeliebenden Land- und Wasserpflanzen (siehe Fig. 6–7), die im E-Interglazial ähnlich wie im Postglazial in der ersten, im F-Interglazial mehr in der zweiten Hälfte liegen. Wie im D-Interglazial fehlt den meisten E- und vielen F-Diagrammen *Fagus*, wogegen *Carpinus* allgemein stärker als im Postglazial vertreten ist, somit die Hainbuche die Stelle der Rotbuche eingenommen hat. Gewisse Unterschiede zwischen den einzelnen Interglazialen und dem Postglazial ergeben sich auch in der Verbreitung der Weisstanne (*Abies*) und der Stechpalme (*Ilex*), die mehrmals weiter als im Postglazial verbreitet waren, beide im D-Interglazial bis Mittelrussland.

[1] H. GAMS, Z. Gletscherk. *18*, 279 (1930); Eclog. Geol. Helv. *28*, 1 (1935); Int. Rev. Hydrobiol. und Hydrogr. *35*, 611 (1937); Quartär *1*, 75 (1938); Geol. Bavar. *19*, 364 (1953).

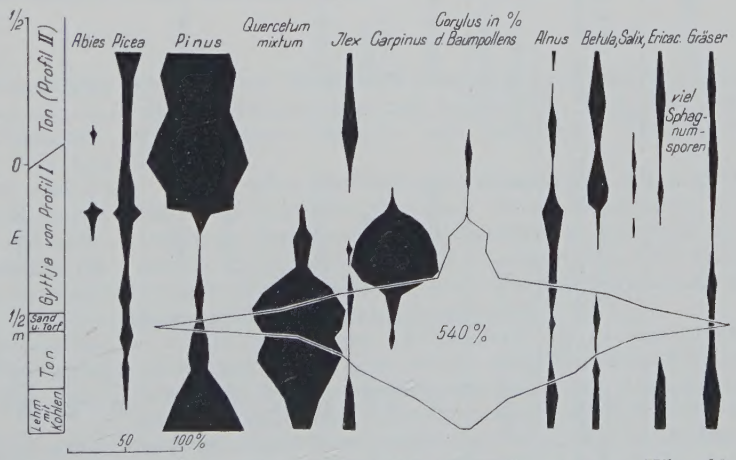


Fig. 7. Pollendiagramm des E-Interglazials von Wallensen in der Hilsmulde [nach I. RABIEN, Eiszeitalter und Gegenwart *3*, 96 (1953)].

[1] E. KOLUMBE, Mitt. Geol. Staatsinst. Hamburg *21*, 46 (1952), *22*, 22 (1953) und *23*, 103 (1954).

[2] K. JESSEN und V. MILTHERS, Danmarks Geol. Unders. II *48*, 380 S., 40 Taf. (1928).

Die folgende Gliederung und Parallelisierung kann heute wohl als gut gesichert gelten.

Jahrtausende		Zeitskala und allgemeine Gliederung	Nordamerika, nach Leverett, Flint u.a.	Atlantik und Mittelmeer, nach Depéret, Dubois u.a.	Niederlande, nach Van der Vlerk und Florschütz	Alpengebiet, nach Penck und Brückner, P. Beck u. a.	Deutschland, nach Keilhack, Woldstedt, Grahmann u.a.	Polen, nach Szafer u. a.	Russland, nach Archangelsky, Mirtschink u. a.
0		Holozän	Postglazial = Nacheiszeit Spätglazial = Deglazial (einschliesslich Allerd-Schwankung und Finiglazial)				Ancylus- und Litorina-Transgressionen		
	Jungquartär	W	Wisconsin	Monastirien	Tubantien	Würm-Eiszeit	Weichsel-Eiszeit	Vistulien (Varsovien II)	Waldai-Eiszeit
		F	Peorian	Warmes Moustérien		Laufen-Schwankung	Rixdorf-Horizont	Warmes Aurignacien	Boreale und Chvalyn-Transgression
		PW	Iowan	Kaltes		Prae-Würm	Kaltes Moustérien	Kaltes Aurignacien	Atel
100	Mittelquartär	E	Sangamon	Tyrrhénien	Eemien	Riss-Würm	Eem-Meer (Unstrut)	Masovien II	Chosar
		RS II				Riss II	Warthe (Fläming)		Moskauer Moräne
		RS I	Illinoian		Drenthien	Riss I	Saale-Eiszeit	Polonien (Varsovien I)	Dnjepr-Eiszeit
		D	Varmouth	(Milazzien ?)	Needien	Grosses Interglazial	Elster-Saale (Holsteinsee, Orla)	Masovien I	Lichvin-Interglazial (Paludinenschichten)
200	Altquartär	M II				Mindel II (Glütsch)	Elster II		
		C			(Cromerien)		Sande von Maur		
		M I	Kansan		Taxandrien	Mindel I (Kander)	Elster I	Cracovien	Lichvin-Eiszeit
300		B	Aftonian	Sicilien	Tiglien (Tegelen)	Günz-Mindel	Tegelen = Ilm	Mizerna-Interglazial	Baku-Schichten
		G II				Günz II			Apscheron
400		A		Calabrien = oberes Villafranchien	Praetiglien = Amstelien				Tschauda
500		G I	Nebraskan			Günz I (einschliesslich Donau ?)	Stettíner Moräne ?		
		Ober-Pliozän		Unteres Villafranchien Piacentin = Plaisancien	Reuverien		Ober-Pliozän		

Eine ähnliche Zweiteilung des «letzten Interglazials» wie im Norden ist auch durch binnenländische Profile ausserhalb der Vereisungsgebiete bezeugt, so für die Weimarer Kalktuffe und viele Lössprofile mit 2 fossilen Böden, die bald als Schwarzerden, bald als Lehmzonen ausgebildet sind, von denen die Kremser wohl dem E- und die Göttweiger dem F-Interglazial entspricht[1].

Unter den Interglazialdiagrammen des Nordalpengebiets, deren sichere Einreihung bisher in den meisten Fällen noch nicht gelungen ist, gibt es nach der neusten und grössten Zusammenstellung von Lüdi[2] ebenfalls solche mit 2 Wärmemaxima (Grandson, Gondiswil, Uznach, Sulzberg bei Wettingen neben solchen mit nur einem in der ersten Hälfte (Pont-La Ville, Mörschwil, Grossweil u.a.) und in der zweiten Hälfte (Cartigny, Wasserfluh, Gundelsei u.a.). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Interglaziale der ersten Gruppe dem E und F, die der zweiten nur dem E und die der dritten nur dem F-Interglazial entsprechen, aus dem als dem jüngsten am meisten Ablagerungen erhalten geblieben sind.

Dem E- und nicht dem D-Interglazial möchte ich nunmehr auch alle alpinen Ablagerungen mit *Rhododendron ponticum* (Hötting, Pianico, Ré, Noranco bei Lugano, Barraux in Savoyen) und ebenso die von Jessen in Irland gefundenen zuschreiben; dagegen dem F-Interglazial ausser den in Pencks letzten Arbeiten für R/W erklärten Terrassenschottern des Inn- und Salzachtals (Laufenschotter), die grosse Mehrzahl der jüngeren, vorwiegend nur Nadelholz führenden Schieferkohlen und weiter die meisten Höhlenbären-Schichten der Alpen-, Jura- und Appenninenhöhlen, somit mindestens den grössten Teil des «Alpinen Paläolithikums», das ja auch bald dem «Riss-Würm», bald der «Aurignac-Schwankung» oder sogar einer spätglazialen Schwankung zugeschrieben worden ist und offenbar mit dem «warmen Moustérien» der Franzosen und Italiener und dem «warmen Aurignacien» in Osteuropa gleichaltrig ist.

Bezüglich der wirklich spätglazialen Interstadiale, namentlich der Allerödschwankung, verweise ich auf meine kürzlich erschienenen Zusammenstellungen[1].

Summary

Report on recent research on the Quaternary development of flora, vegetation and climate in Northern and Central Europe with schematized diagrams from various papers by Florschütz, Lona, Szafer and others showing characteristic differences between the older and the newer Interglacials, designed by the present author.

[1] Fr. Brandtner, Archaeol. Austr. *2*, 5 (1949) und *5*, 101 (1950). – A. Papp und E. Thenius, Sitz.-Ber. Öst. Akad. Wiss. Abt. I *158*, 763 (1949). – R. Lais, Ber. Naturf. Ges. Freiburg i. Br. *41*, 119 (1951).

[2] W. Lüdi, Veröff. Geobot. Inst. Rübel *27*, 208 (1953). – H. Reich, Flora oder Allg. Bot. Ztg. *140*, 386 (1953).

[1] H. Gams, Z. Gletscherk. und Glazialgeol. *11*, 162 (1950) und *2*, 369 (1953); Anthropologie *56*, 281 (1952). Weitere Berichte in Verh. Internat. Botan. Kongresse in Stockholm 1950 und Paris 1954.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Das mittlere Molekulargewicht der Sternmaterie

Der Theorie des Sternaufbaus wird u.a. die Zustandsgleichung der idealen Gase zugrunde gelegt. Die Anwendung dieses Gesetzes auch bis zu Dichten von 50 g/cm³ rechtfertigt man mit der starken Ionisierung der Sternmaterie. Die einzelnen Partikel – Ionen und Elektronen – besässen ein viel kleineres Volumen als die Atome; daher bleibe die Gasgleichung auch bei so hoher Konzentration der Materie gültig.

Wir nehmen der Einfachheit halber an, die Atome der Sternmaterie seien vollständig ionisiert und prüfen unter dieser Voraussetzung die Anwendbarkeit der Gasgleichung.

Wie wird diese hergeleitet? – In *jedem* Falle unter Voraussetzungen, die gegenüber den physikalischen Bedingungen im Sterninnern starke Vereinfachungen bedeuten. Zum Beispiel wird angenommen, dass es sich um ein Partikelsystem in fest begrenztem, nach aussen abgeschlossenem Bereiche mit konstanter Temperatur handle.

Ferner sollen die Wechselwirkungskräfte zwischen den Partikeln entweder nur ganz kurze Reichweiten besitzen, so dass das einzelne Partikel im Zeitmittel sich nahezu kräftefrei bewegt; oder – allgemeiner – sie sollen wenigstens so beschaffen sein, dass Örter und Impulse je zweier Partikel nahezu unkorreliert sind.

In der ionisierten Sternmaterie treten nun starke elektrostatische Kräfte zwischen den Partikeln auf, insbesondere Anziehungskräfte zwischen den Atomkernen und den Elektronen, so dass sicherlich enge Korrelationen zwischen ihren Bewegungen existieren. Die Anwendbarkeit der Gasgleichung ist also *nicht* gesichert. Da man nichts Besseres hat, wird man sie hypothetisch beibehal-

ten. Aber für das mittlere Molekulargewicht μ in der Gasgleichung ist sicherlich nicht das mittlere Molekulargewicht eines Partikels zu nehmen, sondern ein wesentlich höherer Wert.

Die Atomkerne werden die starke Tendenz haben, die Elektronen in ihrer näheren Umgebung in ihrer Bahn mit sich zu ziehen. Im Zeit- und Scharmittel wird jeder Kern von einer bestimmten Anzahl von Trabanten-Elektronen begleitet sein, mit denen zusammen er als *ein* Partikel anzusehen ist. Diese Anzahl ist sicherlich kleiner als die Kernladungszahl.

Einer statistischen Mechanik für Partikelsysteme dieser Art scheinen unüberwindliche Schwierigkeiten entgegenzustehen. *Sämtliche* dem Verfasser bekannten bisherigen Versuche einer solchen Theorie[1] ignorieren an irgendeiner entscheidenden Stelle die Wechselwirkungen oder aber fundamentale Forderungen der statistischen Mechanik. (Vgl. des Verfassers demnächst erscheinende detaillierte Kritik über einige entsprechende Ansätze in der Dynamik der Sternsysteme[2].)

Also: Schon die Anwendung des Gasgesetzes lässt sich nicht mehr wirklich begründen, mag jedoch als eine Extrapolation, als eine (Verlegenheits-)Hypothese hingenommen werden. Aber das μ im Gasgesetz sollte nicht mit der mittleren Partikelmasse identifiziert werden; es ist vielmehr als ein Parameter anzusehen, für den zwar untere und obere Grenzen bekannt sind (vollständiger bzw. gar keiner Ionisation entsprechend zu berechnen), dessen Zahlenwert aber aus Beobachtungsergebnissen zu ermitteln wäre, sofern das möglich ist (aus Masse-Leuchtkraft-Relation usw.).

Die Bestimmungen der chemischen Zusammensetzung der Sterne setzen in wesentlicher Weise μ als mittlere Partikelmasse voraus. Dass sie höchst unsicher, wenn nicht illusorisch sind, darf man hiernach nun wohl annehmen.

R. Kurth

Astronomisches Institut der Universität Bern, den 30. April 1954.

Summary

On account of the electrostatical forces between the ions and electrons in the interior of a star, the mean molecular weight μ should be given a higher value than is usually assumed. It is believed that a satisfactory theoretical calculation of μ has not yet been given, and that it does not seem to be possible. The determinations of the chemical composition of the stars are regarded as shaky, because they are based on the value of μ.

[1] Vgl. zum Beispiel Eddington: *Der innere Aufbau der Sterne*, oder Rosselard: *Astrophysik auf atomtheoretischer Grundlage*.

[2] Z. angew. Math. Phys.

Über die «absoluten» Bewegungen der Milchstrasse und der nächsten Spiralnebel

Das Endergebnis meiner im September 1953 an dieser Stelle veröffentlichten Abhandlung: «Relativ» oder «absolut», für den Zielpunkt und die Geschwindigkeit der gefundenen grossen «absoluten» Translationsbewegung der Erde bzw. der Sonne (relativ zum Lichtäther) lautete: $A = 78°$, $D = +40°$, $v = 650$ km/s. Die Reduktion dieser Geschwindigkeit wegen der Rotation der Milchstrasse (Tangentialgeschwindigkeit der Sonne = 285 km/s) und der Relativbewegung der Sonne zum sie umgebenden Fixsternsystem (20 km/s) beträgt: $-49+7 = -42$ km/s, so dass man für die «absolute» Geschwindigkeit des Milchstrassenzentrums rund 600 km/s annehmen kann. Werden nun an die beobachteten und ebenfalls wegen der galaktischen Rotation und der Sonnenbewegung verbesserten Radialgeschwindigkeiten aussergalaktischer Nebel die Komponenten dieser Milchstrassengeschwindigkeit in der Richtung der Nebel angebracht, so erhält man ihre «absoluten» Radialgeschwindigkeiten, also ihre wirklichen momentanen Bewegungen in bezug auf die Sonne, was zu einer genaueren Kenntnis von Bewegungsvorgängen im aussergalaktischen Raume führt.

In der folgenden Tabelle sind die auf diese Weise berechneten «absoluten» Radialgeschwindigkeiten für alle uns am nächsten stehenden Spiralnebel angegeben, deren Radialgeschwindigkeit bestimmt werden konnte. Ausserdem enthält die Tabelle zum Vergleich noch die «absoluten» Radialgeschwindigkeiten von einigen entfernteren Nebeln, die ungefähr 90° vom Apex der «absoluten» Erdbewegung abstehen[1].

Die ebenfalls mitgeteilten zuverlässigen Mittelwerte der Entfernung und der Radialgeschwindigkeit für den Nebelhaufen in Coma Berenices sollen dazu dienen, die Entfernung des bei der beobachteten Fluchtbewegung der Spiralnebel anzunehmenden «Symmetriepunktes» der «absoluten» Geschwindigkeiten von der Sonne bzw. der Milchstrasse abzuschätzen. Unter der begründeten Voraussetzung, dass die Radialgeschwindigkeiten der Spiralnebel ihren Entfernungen direkt proportional sind, findet man die Entfernung dieses Symmetriepunktes gleich dem Verhältnis der «absoluten» Geschwindigkeiten von Milchstrasse und Nebelhaufen mal Entfernung des letzteren, also ungefähr $6/74 \cdot 13\,800\,000$ Parsec = rund 1 120 000 Parsec in der Richtung des Antapex der «absoluten» Erdbewegung, bei $\alpha = 17^h2$, $\delta = -40°$. Um eine solche Strecke zurückzulegen, brauchte die Milchstrasse bei einer konstanten Geschwindigkeit von 600 km/s die Zeit von 1,83 Milliarden Jahren. Man ist daher versucht, zu sagen, dass die «Explosion» der Welt der Spiralnebel vor mindestens 1,8 Milliarden Jahren stattgefunden hat, einer Zahl, die der Grössenordnung nach gut mit den bisher abgeschätzten 1,3 Milliarden Jahren übereinstimmt, die bei der Expansion des Weltalls zur Verdoppelung der Nebelabstände nötig waren.

Mit der Milchstrasse bewegen sich aber auch die nächsten Nebel nach Ausweis ihrer «absoluten» Radialgeschwindigkeiten vom Symmetriepunkt fort, und zwar bilden sie eine Art von Kette, in der die Milchstrasse sich nahe der Mitte befindet, die Nebel IC 342 und M 33 (letzterer mit einem Abstand von 156 000 Parsec in der Bewegungsrichtung der Milchstrasse) vorangehen, der Nebel NGC 6822 als letzter (in einem Abstand von 125 000 Parsec) nachfolgt, so wie dies in der Tabelle dargestellt ist.

Bei unserer Unkenntnis der wahren Richtungen der resultierenden Bewegungen der einzelnen Nebel erhebt sich nun die Frage, ob diese Nebelgruppe eine gemeinsame Parallelbewegung in der Richtung der «absoluten» Erd- bzw. Milchstrassenbewegung und mit gleicher Geschwindigkeit wie diese hat, oder ob wir es mit einzelnen radialen Bewegungen vom Symmetriepunkt weg zu tun

[1] Diese Angaben verdanke ich Herrn Prof. W. Becker in Basel, der sie für die beiden Nebel IC 342 und NGC 6946 dem Buch von E. Hubble, *Reich der Nebel* (1938), S. 117, für die übrigen nahen Nebel dem Astrophys. Journal *83*, 10 (1936), für die entfernteren dem Handb. der Astrophys. *5*, 856 (1932), und für den Nebelhaufen Coma Ber. seinem Buch *Sterne und Sternsysteme*, 2. Aufl. (1950), S. 398, entnahm.

Tabelle

Name	Entfernung (1000 Parsec) von der Sonne	Entfernung (1000 Parsec) vom Symmetriepunkt	Radialgeschwindigkeit (km/s) beobachtet	reduziert	«absolut»	Winkelabstand Apex-Nebel	Parallelgeschwindigkeit (km/s)	Geschwindigkeitsresultante (km/s)
IC 342	—	—	—	+ 150	+ 669	31°	+779	—
M 33	220	1290	− 320	− 155	+ 268	45°	+381	+ 340
M 31	210	1270	− 220	+ 3	+ 386	50°	+605	+ 525
NGC 205	210	1270	− 300	− 77	+ 306	50°	+479	+ 416
NGC 6946	—	—	—	+ 110	+ 313	72°	+999	—
Gr. Mag. W.	26	1110	+ 280	+ 29	− 167	109°	+512	+ 548
Kl. Mag. W.	29	1100	+ 170	− 8	− 321	121°	+615	+ 638
NGC 6822	165	1000	− 150	− 10	− 461	139°	+613	+ 679
				+ 5			+623	
M 101	600	1380	+ 300	+ 453	+ 589	77°	—	+ 957
M 51	1000	1640	+ 250	+ 363	+ 474	79°	—	+ 640
M 63	1100	1690	+ 450	+ 535	+ 624	81°	—	+ 826
NGC 5005	1600	2030	+ 900	+ 964	+1021	85°	—	+1222
Coma Ber. N.	13800	13860	+7360	+7379	+7385	89°	—	+7409

haben. Für die erstere spricht die Tatsache, dass die reduzierten Radialgeschwindigkeiten im allgemeinen relativ klein sind. Nimmt man somit die Parallelbewegung als bestehend an, so kann man für jeden Nebel aus der «absoluten» Radialgeschwindigkeit als Komponente die resultierende Parallelgeschwindigkeit ableiten, die im Falle wirklicher Parallelität und bei richtigen Angaben 600 km/s betragen wird. Die in der Tabelle ebenfalls enthaltenen Werte dieser so berechneten Parallelgeschwindigkeit stimmen so gut überein, als es die zum Teil erhebliche Unsicherheit der gemessenen Radialgeschwindigkeiten (sie ist zum Beispiel bei NGC 205 etwa 50 km/s) zulässt, und sind im Mittel 623 km/s, bestätigen also den angenommenen Wert genügend.

Setzt man dagegen voraus, dass jeder einzelne der nahen Nebel sich ebenso radial vom Symmetriepunkt fortbewegt wie die weiter abstehenden Spiralnebel, so ergeben sich für die Nebel, deren Entfernungen bekannt sind, wiederum aus den «absoluten» Radialgeschwindigkeiten als Komponenten die in der Tabelle als Geschwindigkeitsresultante bezeichneten Werte. Diese Zahlen zeigen einen auffallenden Gang, indem sie mit der Entfernung der Nebel vom Symmetriepunkt deutlich abnehmen, was der sonst allgemein beobachteten Zunahme widerspricht. Es ist daher wahrscheinlicher, dass die nahen Nebel gemeinsam mit der Milchstrasse eine Parallelbewegung ausführen, als dass jeder für sich in Einzelbewegung begriffen ist. Aus den Zahlen für die in der Tabelle noch verzeichneten entfernteren Nebel, besonders aus ihren erheblichen reduzierten Radialgeschwindigkeiten ersieht man ohne weiteres, dass diese Nebel in keiner Verbindung mit der nahen Nebelgruppe stehen und auch keine Parallelbewegung haben.

Sehr wünschenswert wäre es, wenn zur Kontrolle der hier mitgeteilten Resultate neue und genauere Beobachtungen der Nebel gemacht würden und die Zahl der Objekte in der lokalen Nebelgruppe durch Bestimmung der Radialgeschwindigkeiten und Entfernungen weiterer Spiralnebel vergrössert werden könnte.

L. Courvoisier

Riehen, den 12. April 1954.

Summary

(1) The milky way is moving "absolutely" (relative to the light-ether) with a velocity of at least 600 km/s in the direction of the "absolute" movement of the earth ($A = 78°$, $D = +40°$).

(2) The "point of symmetry" of the "absolute" velocities of the spirals is situated about 1,120,000 parsec from the milky way in the direction of the antapex of his "absolute" movement, and it has taken 1·83 milliards of years for the milky way to cross this distance.

(3) Probably the next spirals are forming with the milky way as a center a group with a common parallel movement like that one of the milky way.

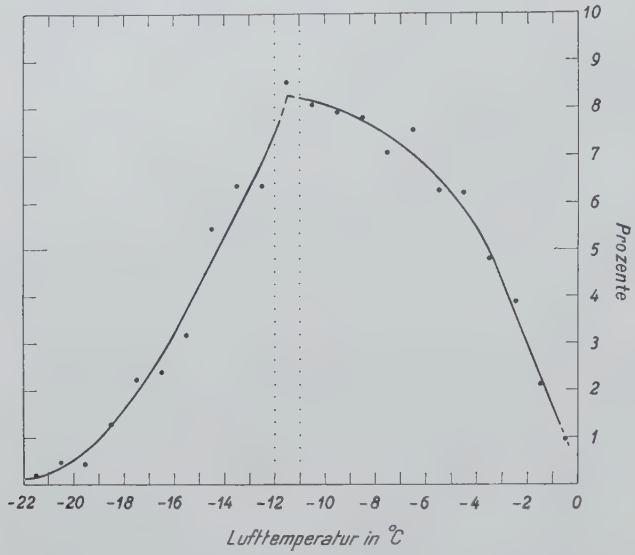
Schneefall und Lufttemperatur

Kürzlich habe ich durch Bearbeitung der auf dem Weissfluhjoch (2670 m) angestellten meteorologischen Beobachtungen gezeigt, dass das Raumgewicht des neugefallenen Schnees stark von der gleichzeitigen, wie üblich in 1,5–2,0 m über dem Boden gemessenen Lufttemperatur abhängig ist und bei etwa −11°C sein Minimum aufweist[1]. Gleichzeitig haben die meteorologischen Beobachtungen auf dem Weissfluhjoch auch erkennen lassen, dass dort die Frequenz der Schneefälle um die angegebene Lufttemperatur am grössten ist. Da die Beobachtungsdaten vom Weissfluhjoch, die in der erwähnten Untersuchung benutzt wurden, nicht sehr zahlreich sind, habe ich versucht, das letztgenannte Ergebnis durch Benutzung der meteorologischen Beobachtungen auf dem Säntis (2500 m) aus dem 15jährigen Zeitraum 1938–1952 zu überprüfen[2]. In allen Wintermonaten (Oktober–Mai) dieser Jahre wurden die Terminbeobachtungen mit Schneefall herangezogen und die gleichzeitigen Lufttemperaturen in Gruppen (–0,1/–1,0; –1,1/–2,0;...) eingeteilt. Unter Ausschluss der wenigen Niederschlagsfälle, welche bei einer Lufttemperatur von 0°C auftraten, umfassen die behandelten Terminbeobachtungen rund 1870 Fälle. Die entsprechende Verteilung der Lufttemperaturen (in Prozenten) wird in der Abbildung gezeigt. Diese Verteilung bestätigt eindeutig das Maximum der Frequenz des Schneefalles zwischen −11° und −12°C. Ausserdem zeigt die Abbildung, dass sich die mittlere Kurve der erhaltenen Verteilung aus

[1] M. Bossolasco, Nature 1954 (im Druck).

[2] Ann. Schweiz. Meteorolog. Zentralanst. Zürich 1938–1952.

zwei getrennten Ästen zusammensetzt: aus einem für Werte der Lufttemperatur grösser als $-11°/-12°C$ und einem zweiten für niedrigere Lufttemperaturen.



Frequenzverteilung des Schneefalls auf dem Säntis (1938–1952) in Abhängigkeit von der Lufttemperatur.

Diese Ergebnisse lassen sich folgendermassen interpretieren.

Zunächst muss darauf hingewiesen werden, dass fast alle benützten Terminbeobachtungen sich auf Schneefälle im Nebel beziehen, indem die Fälle ohne Nebel weniger als 1 % betragen. Das bedeutet, dass bei Schneefall der Gipfel des Säntis fast immer in (unterkühlten) Wolken steckt.

Nun ist aus der guten Übereinstimmung zwischen dem Gefrierkernspektrum aus Laboratoriumsversuchen und der Eisbildung in der Atmosphäre bekannt, dass das absolute Maximum der Gefriertemperaturen ebenfalls um $-11°/-12°C$ auftritt[1]. Befindet sich nun der Berggipfel in einer Wolke, welche an dieser Stelle diese Temperatur hat, so ist die Wahrscheinlichkeit für Schneebildung und daher für Schneefall am grössten.

Wenn sich die Wolke oder, genauer gesagt, der Teil der Wolke, wo eine Temperatur von $-11/-12°C$ herrscht, höher als der Berggipfel befindet, so hat der dort gebildete Schnee die Möglichkeit, sich in verschiedenen Richtungen zu zerstreuen, und daher wird die Wahrscheinlichkeit von Niederschlag auf dem Berggipfel vermindert. Die konvexe Form der Kurve, welche die Frequenzverteilung für höhere Temperaturen als $-11/-12°C$ angibt, entspricht der mittleren Lufttemperatur in der betrachteten Niederschlagsperiode, welche eindeutig höher als $-11°C$ ist.

Mit Ausnahme der Fälle von Inversionen, wo am Berggipfel die Lufttemperatur, bzw. die Temperatur des dortigen Teiles der Wolke, niedriger als $-11/-12°C$ ist, kann dort die Schicht der maximalen Gefrierkern-Wirkung keinen direkten Beitrag liefern, und daher nimmt die Frequenz des Schnees mit der Lufttemperatur stark ab.

Die für den Säntis erhaltene Schneefallverteilung in Abhängigkeit von der Lufttemperatur lässt sich auch für andere Orte bestätigen. Sie beweist ganz eindeutig die Wichtigkeit der Lufttemperatur von $-11°/-12°C$ für die Schnee- und daher auch für die Hagelbildung. Es scheint daher zweckmässig, in Zukunft die physikalischen Erscheinungen um diese Temperaturen näher zu erforschen sowie aerologisch das Verhalten der betreffenden Isothermen eingehend zu verfolgen.

M. Bossolasco

Istituto Geophysico, Università di Genova, den 8. Mai 1954.

[1] W. Rau, Geofisica pura e appl. *26*, 75 (1953).

Summary

The meteorological observations obtained at the Säntis (2500 m) show a frequency-distribution of the air-temperature during snowfall with a clear maximum near $-11°C$. This was already pointed by the author with the data recorded at the Weissfluhjoch (2700 m) and was also proved by the observations made at the top of other high mountains.

The results has therefore a general validity and indicates that the formation of snowflakes (i.e. of precipitations) is chiefly controlled by the occurrence of an air-temperature near $-11°C$ in (supercooled) clouds.

Röntgenographische und spektrographische Untersuchungen am Bazzit vom Val Strem (Kt. Graubünden, Schweiz)

Nach Parker, de Quervain und Weber[1] sind im östlichen Aarmassiv wiederholt Bazzitstufen gefunden worden. Vor kurzem wurde Bazzit auch im mittleren Aarmassiv durch Beck festgestellt (vgl. Huttenlocher[2]). Im Sommer 1952 gelang es Hager im oberen Val Strem aus Blockmaterial eine weitere Bazzitstufe zu isolieren.

Die spektrographische Untersuchung wurde mittels eines Zeiss-Quarzspektrographen Q 24 nach der Glimmschichtmethode im Kohlebogen (vgl. Mitchell[3]) mit folgendem Analysenbefund vorgenommen: Hauptbestandteile: Be (st st), Si (st st), Al (st st), Mg (st st), Fe (st), Sc (st st), Na (st), Ca (m); Vergleichsaufnahmen ergaben einen Sc-Gehalt von rund 3 Gew. %. – Nebenbestandteile: Ga (ss), V (ss), Sn (ss), Cu (s), Yb (ss), Y (ss-sss), Ag (sss), Sr (m), Ba (st). – Demnach dürfte der Bazzit im wesentlichen ein Be-Al-Silikat mit Sc, Fe sowie Alkalien und Erdalkalien sein. Diese am Bazzit schweizerischer Provenienz ermittelten Analysendaten weichen somit von denen Artinis[4] ab (unter anderem Be abwesend). Inzwischen hat Bertolani[5] an italienischem Material spektrographische Untersuchungen vorgenommen und dabei qualitativ im wesentlichen die gleichen Elemente wie wir gefunden.

Ein Bazzitkriställchen von einer Stufe aus dem Val Strem wurde zerkleinert, und von einem Splitter wurden Dreh- und Weissenberg-Aufnahmen hergestellt, welche die Gitterkonstanten $a = 9{,}50$, $c = 9{,}18$ Å und die Raumgruppe $D^2_{6h} - P6/mcc$ (evtl. $C^2_{6v} - P6cc$) [$(hkil)$ alle Ordnungen; $(hh\bar{2}\bar{h}l)$, $(h\bar{h}0l)$ und $(000l)$ nur mit $l = 2n$ vorhanden] lieferten. Aus verschiedenen Gründen vermuten

[1] R. L. Parker, F. de Quervain und F. Weber, Schweiz. min. petr. Mitt. *19*, 293 (1939).

[2] H. Huttenlocher, *Über die Grimsel*, Festgabe an die Teilnehmer der Versammlung der Schweiz. Naturf. Ges. in Bern *1952*, S. 24.

[3] R. L. Mitchell, Commenwealth Bureau of Soil Science (Harpenden, Engl.), Tech. Comm. No. 44 (1948).

[4] E. Artini, Rend. R. Accad. Lincei Roma [5] *24*, 313 (1915).

[5] M. Bertolani, Rend. Soc. Min. Ital. *5*, 73 (1948).

wir, dass der Bazzit eine Struktur vom *Berylltypus* aufweist. Die detaillierte Kristallstrukturbestimmung ist im Gange.

Wir danken Herrn Ing. O. Hager für die Bazzitstufe, Herrn Prof. W. Feitknecht für die Überlassung des Spektrographen und den Herren Dr. H. Bürki und G. F. Bonsma für die Herstellung der Röntgenaufnahmen.

H. Huttenlocher, Th. Hügi und W. Nowacki

Mineralogisch-Petrographisches Institut der Universität Bern, den 6. Juli 1954.

Summary

Bazzite recently found in Val Strem (Aarmassif, Ct. Graubünden, Switzerland) was investigated by means of X-ray (lattice constants, space group) and spectrographic methods (major and minor constituents). It seems to have a structure of the beryl type.

Separation of *Cis*- and *Trans*-Azobenzene by Chromatography on Paper

We have found that *cis*- and *trans*-azobenzene can be separated by chromatography on paper using acetic acid (40%) as eluent. The *cis*-form migrates with the eluent as a yellow spot while *trans*-azobenzene remains stationary. The method was applied also to the separation of the two isomers from a solution of *trans*-azobenzene placed on filter paper and irradiated, while wet, by sun or ultraviolet light. Using a quartz vessel, the separation can also be effected by simultaneous irradiation and chromatography of *trans*-azobenzene, the *cis*-azobenzene appearing here as a yellow band. Separations of other geometrical isomers will be reported shortly.

M. Frankel and R. Wolovsky

Department of Organic Chemistry, The Hebrew University, Jerusalem, Israel, May 15, 1954.

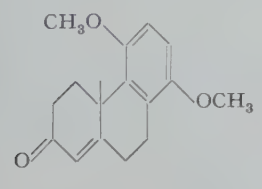
Zusammenfassung

Cis- und *trans*-Azobenzol lassen sich papierchromatographisch durch Elution mit wässriger Essigsäure trennen.

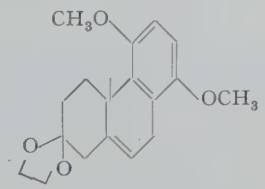
Versuche zur Synthese von Verbindungen der Steroidreihe

4b-Methyl-1,2,3,4,4aα,4b,5,6,7,9,10,10aβ-dodekahydrophenanthren-1,4,7-trion

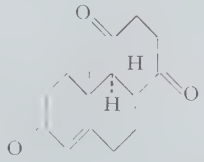
Vor mehreren Jahren wurde eine Synthese von 7-Keto-1,4-dimethoxy-4b-methyl-4b,5,6,7,9,10-hexahydrophenanthren (I) beschrieben[1], das am bequemsten aus Chloropren und Benzochinon erhältlich ist[2].



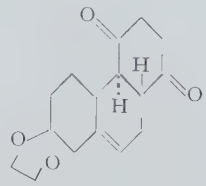
I



II



III



IV

Nach einem durch äussere Umstände bedingten Unterbruch haben wir unsere Versuche zur Totalsynthese von Verbindungen der Steroidreihe wieder aufgenommen und in diesem Zusammenhang die Reduktion des Äthylenketals II von I untersucht. II liess sich mit Lithium in flüssigem Ammoniak, das kürzlich von Wilds und Nelson[3] bei schwer reduzierbaren aromatischen Systemen mit Erfolg verwendet worden ist, reduzieren. Saure Hydrolyse des rohen Reduktionsproduktes (Dihydroderivat von II) lieferte ein Triketon vom Smp. 121°, das mit dem anti-trans-4b-Methyl-1,2,3,4,4aα,4b,5,6,7,9,10,10aβ-dodekahydro-phenanthren-1,4,7-trion (III) von Poos *et al.*[4] identisch war. Unsere Synthese liefert demnach die den natürlichen Steroiden entsprechende Verknüpfung der drei Ringe.

Bei der schonenden Hydrolyse des Dihydroderivates von II nach der früher beschriebenen Methode[5] blieb die Ketalgruppe in 3-Stellung intakt. Das so erhaltene Triketon-monoketal IV vom Smp. 124° war mit einer nach Poos *et al.*[4] hergestellten Probe identisch.

Wir danken Herrn Prof. T. Reichstein sowie der Haco-Gesellschaft, AG., Gümligen, für die Förderung dieser Arbeit.

C. A. Grob und O. Schindler

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel, den 18. Juni 1954.

Summary

Reduction of the ketal II of 7-keto-1,4-dimethoxy-4b-methyl-5,6,7,9,10-hexahydrophenanthrene with lithium in liquid ammonia furnishes a corresponding dihydro derivative, from which a tricyclic triketone, m.p. 121°, is obtained upon acid hydrolysis. This triketone is identical with the recently described anti-trans-4b-methyl-1,2,3,4,4aα,4b,5,6,7,9,10,10αβ-dodecahydro-phenanthrene-1,4,7-trione III and thus conforms to the stereochemistry of the natural steroids.

[1] C. A. Grob und W. Jundt, Helv. chim. Acta *31*, 1691 (1948). – C. A. Grob und H. Wicki, Helv. chim. Acta *31*, 1706 (1948).

[2] C. A. Grob und W. Jundt, Helv. chim. Acta *35*, 2111 (1952).

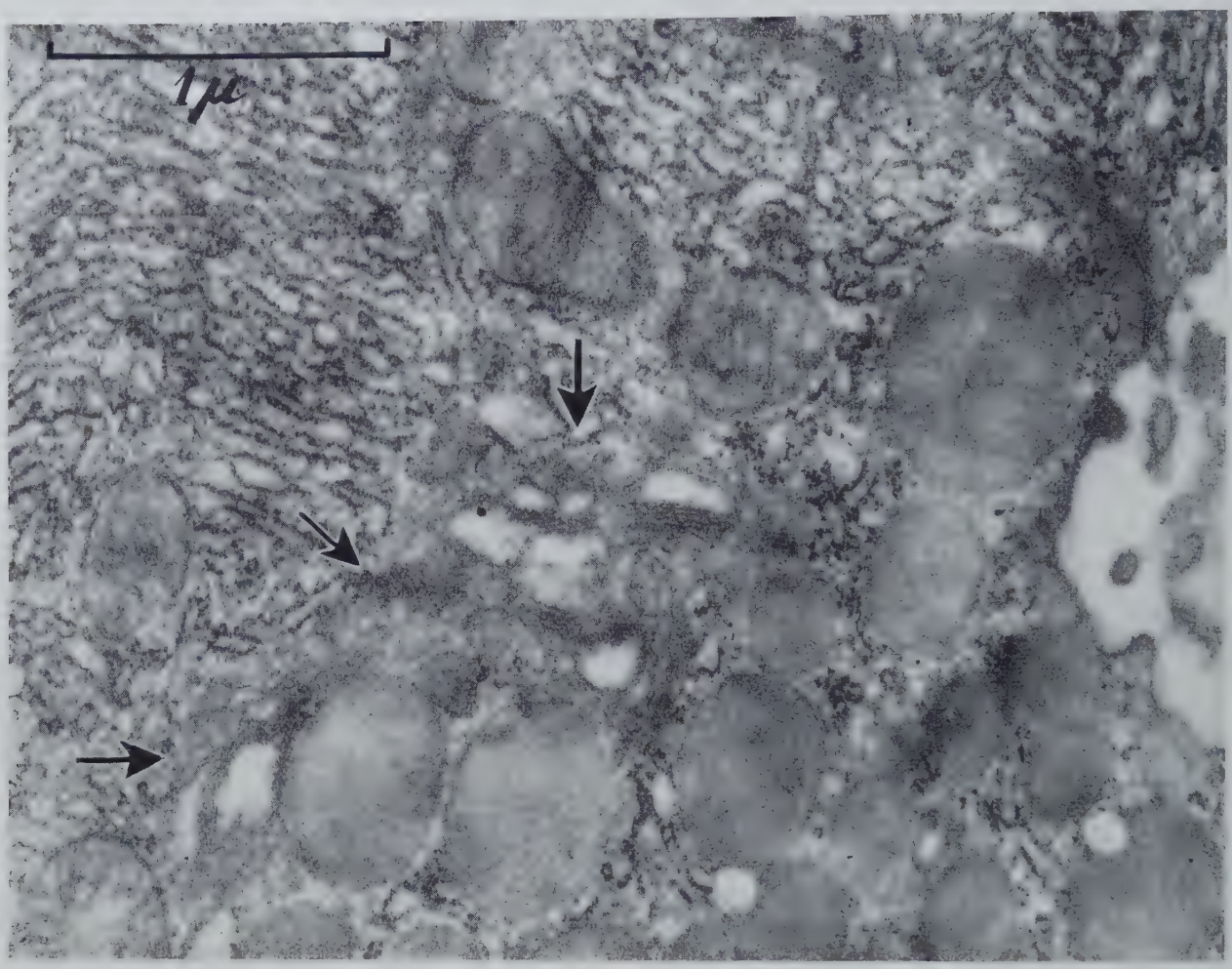
[3] A. L. Wilds und N. A. Nelson, J. Amer. Chem. Soc. *75*, 5360 (1953).

[4] G. I. Poos, G. E. Arth, R. E. Beyler und L. H. Sarett, J. Amer. Chem. Soc. *75*, 422 (1953). Wir danken der CIBA-Aktiengesellschaft für die freundliche Überlassung dieses Materials.

[5] C. A. Grob, W. Jundt und H. Wicki, Helv. chim. Acta *32*, 2427 (1949).

Electron Microscopy of the Golgi Apparatus of the Exocrine Pancreas Cells

The lack of agreement reflected in literature as to the interpretation of the Golgi apparatus is due to the inadequacy of light microscopical techniques for visua-



Golgi apparatus (indicated by the arrows) in exocrine cell of mouse pancreas. The arrows point to a region of the Golgi apparatus containing Golgi granules. To the right an excretory duct, in the lower part of the picture zymogen granules, above the Golgi apparatus mitochondria and in the left upper part and between other cell components intracellular cytoplasmic membranes. In the right upper corner, the cell membranes of two adjacent cells. Magnification: 46,000 ×.

lizing this cytoplasmic component. These techniques are not sufficiently specific even to make it certain that different investigators have been studying identical structures under the classification of Golgi apparatus. The difficulties in observing the Golgi apparatus in living normal cells has also contributed to doubts as to its reality.

Dalton and Felix[1] have demonstrated a Golgi apparatus in epithelial cells supravitally in teased preparation using phase contrast microscopy. In electron micrographs of sections through the same kind of cells they observed "cytoplasmic strands" and vacuoles indicating a region organized differently from the rest of the cytoplasm. Dalton and Felix[2] later described the Golgi material as consisting of vacuoles marginated "by lamellae comparable to those of the basophilic substance".

In connection with a study of the ultrastructural organization of the mouse pancreas, a structurally well-defined cytoplasmic region has constantly been observed in the distal part of the cells. As the cytoplasm of these cells is organized in a very characteristic way (Sjöstrand[1], Sjöstrand and Hanzon[2]), these regions appear with great distinctness forming sharply outlined areas of rather irregular form and with a structure contrasting to the rest of the cytoplasm. The localization of these zones corresponds exactly to the site of the Golgi apparatus as determined by means of light microscopy.

This study was performed on ultra-thin sections prepared with the Sjöstrand[3] ultramicrotome. The tissue was fixed in isotonic acetate-veronal buffered osmium tetroxide solution (pH 7·2). Due to the minute thickness of the sections, high resolution pictures could be obtained which made it possible to observe a series of structural components within the Golgi zone. In a finely granular or homogeneous *ground substance*, a group of three to five tightly packed pairs of membranes or lamellae are embedded. These Golgi *membranes* are smooth and, in contrast to the cytoplasmic membranes (Sjöstrand[1], Sjöstrand and Hanzon[2]), they are not associated with any opaque particles. They show a

[1] A. J. Dalton and M. D. Felix, Am. J. Anat. *92*, 277 (1993).
[2] A. J. Dalton and M. D. Felix, J. Appl. Phys. *24*, 1425 (1953).

[1] F. S. Sjöstrand, Nature *171*, 30 (1953).
[2] F. S. Sjöstrand and V. Hanzon, Exptl. Cell Res. (in press).
[3] F. S. Sjöstrand, Exper. *9*, 114 (1953).

fairly irregular course and to a varying extent are split apart by vacuolar spaces of more or less irregular form.

In addition to the GOLGI membranes, *granules* are found in the GOLGI ground substance. These granules show intimate topographic relationship to the GOLGI membranes. Their size, form and opacity varies considerably. The biggest granules are zymogen granules, exhibiting all the characteristic morphological features of such granules. There are found all kinds of transmission stages from small sized granules to these zymogen granules. Topographic relationships produce the impression of a transition of GOLGI membrane material into granules which, when moving away from the membrane zone, are gradually transformed into zymogen granules. Further studies which take the time factor into account seem necessary for a sound interpretation of such relationships.

Our experiments using starving and fed animals, and injections of pilocarpine hydrochloride, in order to vary the functional conditions of the exocrine pancreas cells, have failed to present sufficiently well-defined states of activity for a more critical analysis of the functional significance of the GOLGI apparatus.

One great difficulty in accepting the GOLGI apparatus as a preformed cell component has been the lack of a specific method for demonstration. The high degree of organization observed in EMG's of the GOLGI apparatus, make it now stand out as a morphologically well-defined and characteristic cell component which is easily recognized in the cell. It certainly impresses us as a structure that is preformed in the living cell.

A cell component similar to the one described here as the GOLGI apparatus has been observed in the columnar epithelial cells, in the GOBLET cells of the intestines (SJÖSTRAND and ZETTERQUIST[1]) and in the tubular cells of the mouse kidney (RHODIN[2]).

A more detailed report on this study will be presented in Experimental Cell Research.

This investigation has been supported by grants from the Knut and Alice Wallenberg Foundation, the "Riksföreningen för Kräftsjukdomarnas bekämpande" and the Foundation "Therese och Johan Anderssons Minne".

F. S. SJÖSTRAND and V. HANZON

Department of Anatomy, Karolinska Institutet, Stockholm, March 5, 1954.

Zusammenfassung

In den exokrinen Pankreaszellen der Maus wurde der Golgiapparat im Elektronenmikroskop mit hoher Auflösung auf ultradünnen Schnitten studiert. Der Golgiapparat zeichnet sich durch ein deutlich abgegrenztes, unregelmässiges Zytoplasmagebiet mit eigenartiger Struktur aus, wobei man drei verschiedene Komponenten unterscheiden kann: 1. eine fast homogene Grundsubstanz; 2. Gruppen von 3 bis 5 dicht gepackten Golgimembranpaaren, von unregelmässigen Vakuolbildungen getrennt; 3. Golgigranula von verschiedener Form, Grösse und Dichte. Die grössten sind typische Zymogengranula.

[1] F. S. SJÖSTRAND and H. ZETTERQUIST, in preparation.

[2] J. RHODIN, *Correlation of Ultrastructural Organization and Function in Normal and Experimentally Changed Proximal Convoluted Tubule Cells of the Mouse Kidney* (Stockholm, 1954).

Electron Microscopy of the Intercalated Discs of Cardiac Muscle Tissue

The interpretation from light microscopic observations of the significance of the intercalated discs of heart muscle has been very controversial. A very extensive light microscopic study was presented by AURELL[1] in a monograph in which the literature was carefully reviewed up till 1945. Even earlier electron microscopic studies[2] have failed to give a conclusive answer. The intercalated discs have recently been subject to a histochemical study by BOURNE[3] who found a high enzyme concentration in the discs indicating their interest from a biochemical point of view.

The present study, which will be reported on in more detail elsewhere, has revealed that the intercalated discs of cardiac muscle tissue represent cell boundaries of a special kind. This type of cell boundary is, however, far from unique as far as pure morphology is concerned.

Heart muscle from frog, mouse and guinea pig has been studied after fixation in buffered isotonic osmium tetroxide solution (modified Palade solution[4]) embedded in methacrylate and sectioned with the ultra-microtome designed by SJÖSTRAND[5]. The about 200 Å thick sections have been studied in an RCA EMU 2 c electron microscope without dissolving or subliming the embedding medium.

Figure 1 shows a longitudinal section through a myofibril from guinea pig heart muscle. The myofibril consists of two fibril components similar to those described by HUXLEY[6] (not clearly shown in this picture). At the end of the sarcomere seen in the picture a very opaque zone runs across the whole diameter of the myofibril. In the middle of this dark zone a bright line is observed. At higher magnification, as in Figure 2 (which is from a section in series with that presented in Fig. 1), it is seen that the bright, less opaque line has a sharp boundary against the opaque material; and in very thin sections a well defined thin dark line is observed at this boundary. This thin line is continuous with the sarcolemma facing the interstitial connective tissue spaces.

The elementary fibrils of the myofibrils do not bridge over the gap formed by the less opaque area of the intercalated disc.

The width of this bright zone is 150–200 Å. The adjacent opaque areas show a finely granular appearance. Its boundary towards the sarcomere is somewhat irregularly outlined and not sharply demarcated as it is towards the bright central zone.

The analysis of a great number of EMG's indicate that the cardiac muscle tissue is completely subdivided into units representing cell territories without any anastomoses. This conclusion is further supported by the very careful light microscopic study of AURELL[7] with three dimensional reconstruction of the arrangement of the intercalated discs. The rod-like structure frequently observed at the intercalated discs when studied by means of light microscopy corresponds to a wavy arrangement of the cell boundary at the site of the disc. When the amplitude of these waves is pronounced

[1] G. AURELL, *Die Glanzscheiben des Herzmuskelgewebes und ihre Verbindungen* (Stockholm, 1945).

[2] V. L. VAN BREEMEN, Anat. Rec. *117*, 49 (1953).

[3] G. H. BOURNE, Nature *172*, 588 (1933).

[4] G. PALADE, J. exptl. Med. *95*, 285 (1952).

[5] F. S. SJÖSTRAND, Exper. *9*, 114 (1953).

[6] H. E. HUXLEY, Biochim. biophys. Acta *12*, 387 (1953).

[7] G. AURELL, *Die Glanzscheiben des Herzmuskelgewebes und ihre Verbindungen* (Stockholm, 1945).

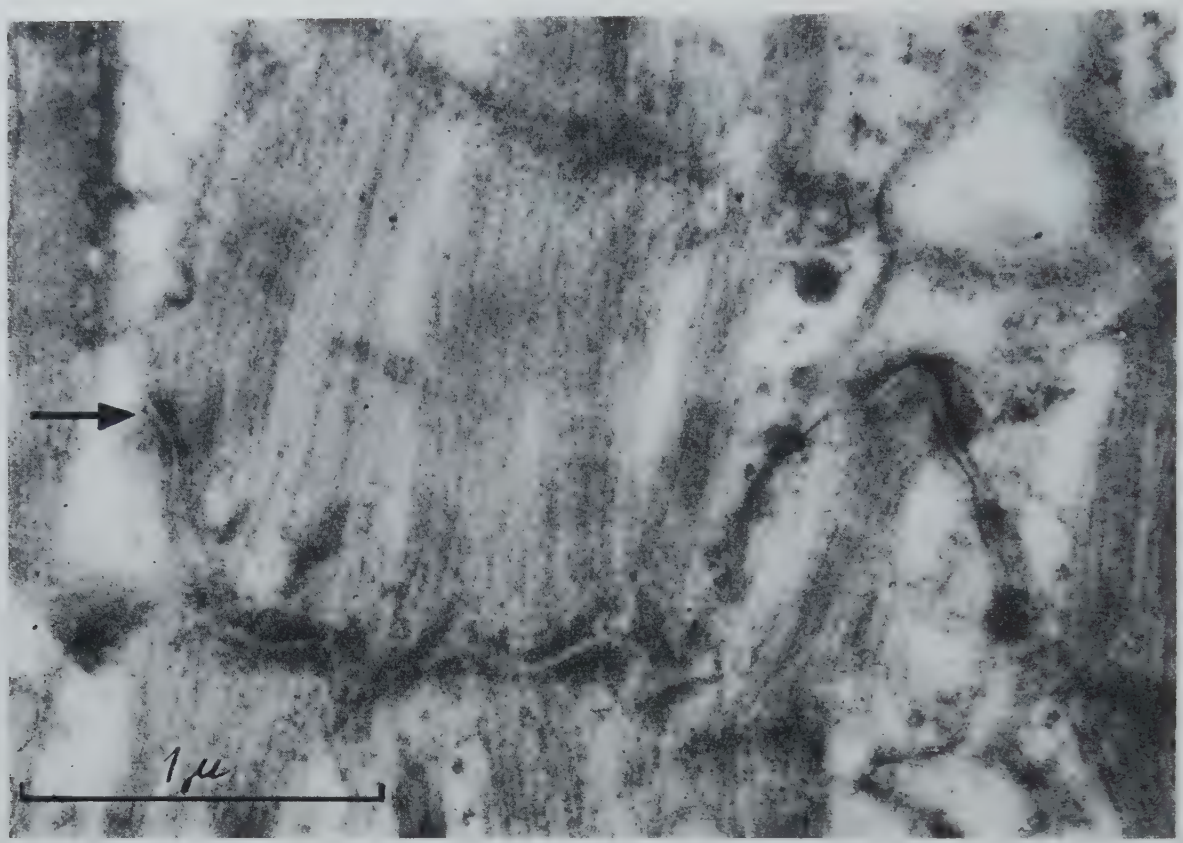


Fig. 1.—Longitudinal section through a cardiac muscle myofibril. In the lower part an intercalated disc extending across the myofibril. Magnification 48,000 ×.

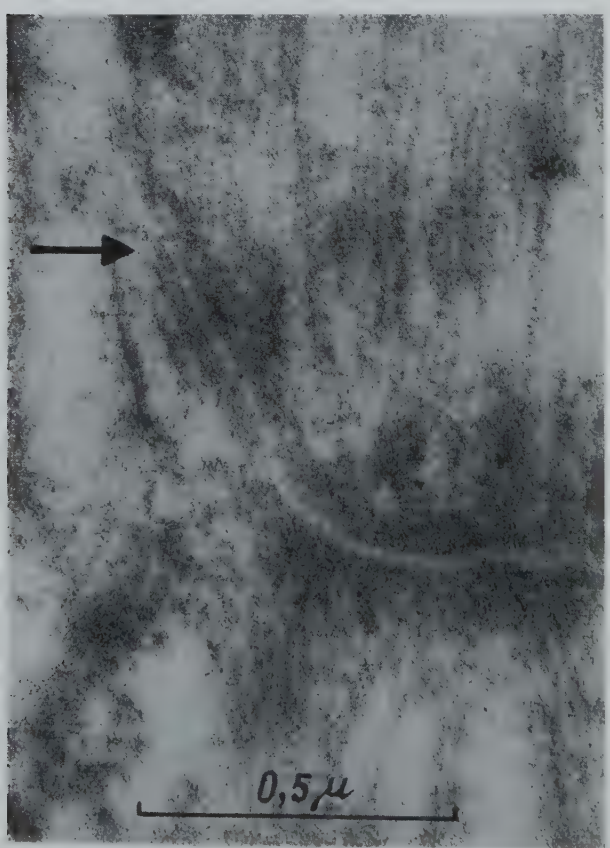


Fig. 2.—The left part of the same intercalated disc as shown in Figure 1 but from a section in series with that shown in Figure 1. The relation between the sarcolemma and the intercalated disc is shown. Magnification 84,000 ×.

they will appear as rods at the resolution of the light microscope.

The cardiac muscle tissue, as composed of well defined individual heart muscle cells, is important to consider when discussing the spreading of the excitatory state through the cardiac muscle. The observations of Bourne regarding the occurrence of succinic dehydrogenase and non-specific alkaline phosphatase in the intercalated discs point to their possessing considerable metabolic activity. Bourne assumed that they might act as boosters of the contraction wave spreading through the cardiac muscle tissue at the heart beat.

A similar appearance of cell boundaries has been observed in several other tissues, for instance, the epidermis of frog skin[1], the so-called external limiting membrane of the retina of the guinea pig eye[2] and the exocrine cells of the pancreas[3].

F. S. Sjöstrand and Ebba Andersson

Department of Anatomy, Karolinska Institutet, Stockholm, April 10, 1954.

Zusammenfassung

Eine elektronenmikroskopische Analyse ultradünner Schnitte durch Herzmuskelgewebe hat ergeben, dass die sogenannten Glanzscheiben speziell organisierte Zellgrenzen sind. Das Herzmuskelgewebe ist folglich in Herzmuskelzellen eingeteilt und bildet kein Synzytium. Die Elementarfibrillen der Muskelfasern erreichen die Zellgrenzen an den Glanzscheiben, überbrücken aber nicht die 150–200 Å breite Zone zwischen den opaken Partien der benachbarten Zellgrenzen.

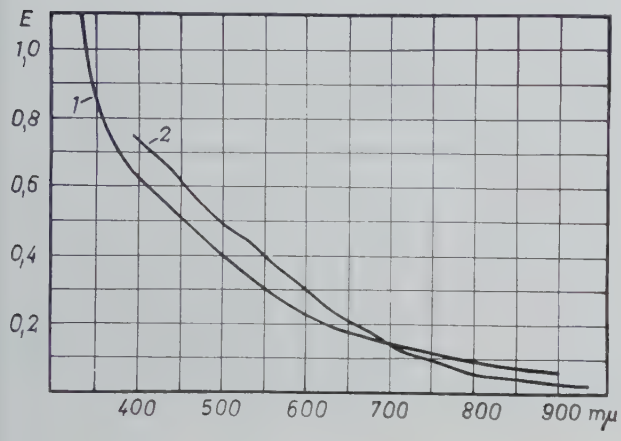
[1] D. Ottosson, F. S. Sjöstrand, S. Stenström, and G. Svaetichin, Acta physiol. Scand. *106*, 611 (1953).

[2] F. S. Sjöstrand, J. Cell. and. Comp. Physiol. *42*, 45 (1953).

[3] F. S. Sjöstrand and V. Hanzon, Exptl. Cell. Res. (in press).

Absorptionsspektrum von Melaninpigment[1]

Melaningranula im Durchmesser von etwa 2–4 μ, von einem Fall von ausgedehnter Melanoblastomatose beim Menschen isoliert und einzeln mikrospektrophotometrisch ausgemessen, zeigen folgendes Extinktionsdiagramm (siehe Abbildung, Kurve 2): die Absorption beginnt im roten Bereich des sichtbaren Lichtes und steigt von dort zunehmend und stetig an bis zum violetten Ende des Spektrums. Ein ausgesprochenes Extinktionsmaximum fehlt.



Extinktionsdiagramme von einzelnen Melaninpigmentkörnchen (Kurve 2) und vom KOH-Auszug einer Melanoblastommetastase (Kurve 1).

Im allgemeinen muss man bei mikrophotometrischen Messungen in diesen Dimensionen mit einem mehr oder weniger stark ausgeprägten Streufehler rechnen, dessen Ausmass bekanntlich zur kurzwelligen Seite des Spektrums hin erheblich zunimmt. Modellversuche an wässerigen Thioninlösungen, deren Extinktionsmaximum bei 610 mμ liegt und sehr scharf begrenzt ist, und an Thioninkristallen von ähnlicher Grössenordnung wie die gemessenen Melaningranula hatten das sehr deutlich gezeigt. Wenn man zur photometrischen Analyse allerdings Pigmentkörnchen auswählt, die möglichst frei von optischen Inhomogenitäten erscheinen und mit hoher numerischer Apertur (1,25) des Mikroskopobjektivs arbeitet, dann lässt sich das so erhaltene Ergebnis sehr gut vergleichen mit dem Extinktionsdiagramm, das *in vitro* – in Küvetten von 1 cm Schichttiefe – im KOH-Auszug vom gleichen Melanoblastom ermittelt wurde (Abbildung, Kurve 1), und ebenso mit den Beobachtungen von Edwards und anderen. Es zeigt sich also, dass die rein mikroskopisch erhaltenen Absorptionswerte, die bei den vorliegenden Untersuchungen nach den in [3] angegebenen Verfahren ermittelt wurden, mit den Makrowerten durchaus identisch sind.

J. Meyer-Arendt und M. Bayer

Pathologisches Institut der Universität Hamburg, den 14. April 1954.

[1] Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführt.

[2] E. A. Edwards in M. Gordon, *Pigment Cell Growth* (Academic Press Inc., New York 1953), S. 149.

[3] J. Meyer-Arendt, Beitr. path. Anat. *113*, 388, 1953.

Summary

The microphotometric absorptiometry of single isolated melanin granula and the photometric analysis of a KOH extract from a melanoblastoma metastasis show an extinction strongly increasing to the violet end of the spectrum, without any remarkable extinction maximum.

Infrared Spectrometric Research on the Relation Between Ossein and Inorganic Bone Fraction

Much valuable information remains to be gained on the chemical relations existing between ossein and the inorganic bone fraction.

According to Caglioti[1], the ray pattern of bone gives evidence of a semi-combined lattice resulting from ossein and the inorganic fraction.

The conclusions of Dallemagne and Mélon[2], that the birefringence of total bone is due to a combination of the optical properties of the organic and inorganic fractions, in accordance with pure physical laws, have been questioned by Ascenzi[3].

Recently, histochemical investigations (Rubin and Howard[4]), studies on the "local factor" of calcification (Sobel[5]) and radioautographic researches (Dziewiatkowski[6]) seem to demonstrate that the fixation of calcium in bone is related to sulphuric groups of the ossein. Nevertheless, the nature of the substance containing this groups has not yet been ascertained.

Further, Neuman, Boyd, and Feldman[7] have produced evidence that, in cartilage calcification, chondroitin sulfate combines with cations and it is semi-saturated with regard to calcium.

On the other hand, Polonovski and Cartier[8] have found that the first stage of bone calcification corresponds to the phosphorylation of the NH_2 groups of the osteoid. The PO_4 radicals linked in this way to the proteins would also bind calcium.

In this note we report the results of a study by infrared spectrophotometry on total bone, ossein and the inorganic bone fraction.

Experimental.–A Beckman IR_2 spectrometer was used. The samples were prepared from ox femoral diaphysis and they corresponded to (a) sections of total bone 10 micron thick, (b) the same sections decalcified with 2% HNO_3, (c) powder of bone deprived of ossein, according to the method of Gabriel[9].

[1] V. Caglioti, Atti del Vo Congresso di Chimica Pura ed applicata *1935*, 325.

[2] M. Dallemagne and J. Melon, J. Wash. Acad. Sci. *36*, 181 (1946).

[3] A. Ascenzi, Rend. Acc. Naz. Lincei Nota I: Serie VIII *4*, 777 (1948); Nota II: Serie VIII *5*, 100 (1948); Nota III: Serie VIII *5*, 171 (1948); Nature *163*, 604 (1949); Science *112*, 84 (1950). – A. Ascenzi and E. L. Benedetti, Arch. Sci. Biol. *38*, 234 (1954).

[4] P. S. Rubin and J. E. Howard, Trans. Macy Conf. Metabolic Interrelations *2*, 155 (1950).

[5] A. E. Sobel, Trans. Macy Conf. Metabolic Interrelations *4*, 113 (1952).

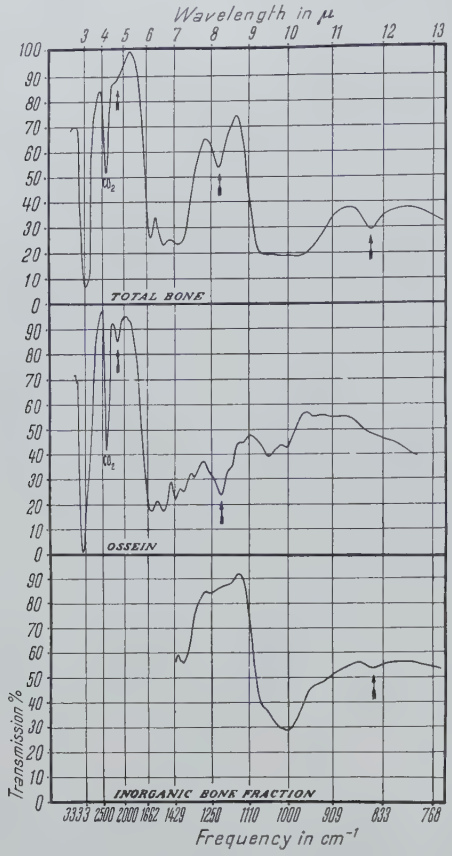
[6] D. D. Dziewiatkowski, Trans. Macy Conf. Metabolic Interrelations *4*, 74 (1952).

[7] W. F. Neuman, E. S. Boyd, and I. Feldman, Trans. Macy Conf. Metabolic Interrelations *4*, 100 (1952).

[8] M. Polonovski and P. Cartier, C. r. Acad. Sci. Paris *232*, 119 (1951).

[9] S. Gabriel, Hoppe-Seyl. Z. *18*, 257 (1894).

Results.–The infrared spectra of total bone, compared with the spectra of ossein as well as those of the inorganic fraction, showed the following main differences (Figure).


Wavelength in μ
3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
TOTAL BONE
OSSEIN
INORGANIC BONE FRACTION
Transmission %
3333 2500 2000 1662 1429 1250 1110 1000 909 833 758
Frequency in cm⁻¹

(a) In the ossein spectra an absoption occurs at a frequency of about 2155 cm^{-1}. The same absorption cannot be detected in the spectra of total bone nor in those of the inorganic fraction. Absorption at 1213 cm^{-1}, found in the ossein spectra, decreases in total bone spectra.

(b) An absorption peak at about 850 cm^{-1}, found in the spectra of inorganic bone fraction, appears much increased in the spectra of total bone.

The results of some of the above-mentioned studies, as well as some of our unpublished results on the spectra of very simple substances, suggest that the absorption at 2155 cm^{-1} in the spectra of ossein is the first overtone of the fundamental and totally symmetric frequency at 1213 cm^{-1} related to the $-SO_2-$ grouping[1].

This view is also supported by the work of Schreiber[2] on the infrared spectra of many compounds containing the $-SO_2-$ grouping, as well as by the research of Mecke[3] on the SO_2 absorption frequencies.

In this connection the disappearance of the frequency at 2155 cm^{-1} in total bone spectra can easily be explained. In fact it is well known that any modification related to the vibrational energy of a functional grouping induces (a) a decrease of the fundamental absorption band, (b) the disappearance of the first overtone. Both the phenomena are present in total bone and suggest that one or both S–O bonds of the sulfonic groupings pertaining to the ossein may occur in a polar form. Such a condition would increase the electro-negativity of the oxygen which in turn would be able to bind calcium.

The spectra of inorganic bone fraction show the absorption frequencies of the orthophosphates (calcium phosphate, according to Corbridge and Lowe[1], Hunt, Wisherd and Bonham[2]). A large absorption band with a maximum at 1002 cm^{-1} corresponds to a totally symmetric frequency related to the PO_4 (see also Herzberg[3]). Another maximum at 850 cm^{-1} strongly increases in total bone. This increase is probably due to a condition of asymmetry related to the PO_4 ion. In this manner the P–O bands would not be energetically equivalent and would determine a change of dipolar moment. The modified phosphoric grouping would form bonds (hydrogen bonds) with the OH or the NH groupings of the fundamental substance of the ossein. The existence of hydrogen bonds is suggested by the displacement observed in the fundamental frequency of the OH grouping (or NH grouping, according to Polonovski and Cartier[4]). In fact this frequency corresponds to 3546 cm^{-1} in ossein spectra and to 3289 cm^{-1} in spectra of total bone.

Conclusion.–The results of our researches may be summarized as follows. In total bone the bonds between ossein and inorganic fraction occur via the sulfonic groupings of the ossein, the PO_4 groupings of the inorganic fraction and hydrogen bonds.

V. Caglioti, A. Ascenzi, and M. Scrocco

Institute of General and Inorganic Chemistry and Institute of Morbid Anatomy, University of Rome, April 14, 1954.

Riassunto

Sulla base di ricerche spettrofotometriche all'infrarosso su sezioni di osso intero, di osso decalcificato (osseina) e di osso privato della frazione organica gli autori sono giunti ai risultati seguenti. Nell'osso intero i legami fra osseina e frazione inorganica sono realizzati dai gruppi solforici dell'osseina, dai gruppi PO_4 della frazione inorganica e da ponti idrogeno.

[1] In the region 1250–950 cm^{-1}, absorption bands are also present related to bonds pertaining to polysaccharides. We have kept account of these bands by means of comparative investigations.

[2] I. C. Schreiber, Anal. Chem. *21*, 1168 (1949).

[3] R. Mecke, Z. physic. Chem. B. *16*, 409 (1932).

[1] D. E. C. Corbridge and E. J. Lowe, J. Chem. Soc. *1954*, 493.

[2] J. M. Hunt, M. P. Wisherd, and L. C. Bonham, Anal. Chem. *22*, 1478 (1950).

[3] G. Herzberg, *Infrared and Raman Spectra* 5 Ed. (Van Nostrand Co. Inc., New York, 1951).

[4] M. Polonovski and P. Cartier, C. r. Acad. Sci. Paris *232*, 119 (1951).

Lipoide und Virulenz bei Typhusbakterien

Die Virulenz bestimmter Typhusstämme wird, wie bekannt, einem besonderen, von Felix[1] entdeckten und von anderen Autoren[2] erforschten Vi-Antigen zugeschrieben. Es interessierte uns, zu prüfen, ob und in welchem Zusammenhange die Virulenz mit dem Lipoidgehalt verschiedener Stämme steht. Dennis[3] fand nämlich, dass sämtliche Lipoidfraktionen eine ähnliche Wirkung auf verschiedene Gewebe ausüben, wie es sonst unter der Einwirkung von Phtionsäure beobachtet wurde. Wir untersuchten zu diesem Zweck zwei stark virulente

[1] A. Felix und R. M. Pitt, J. Path. Bact. *38*, *409* (1934).

[3] A. Boivin, Exposés ann. biochim. méd. *3*, 113 (1942).

[3] E. W. Dennis, Amer. J. Hyg. *32B*, 1 (1940).

Typhusstämme (Vi-Bhatnagar und den bei uns isolierten Stamm Z 47), einen etwas weniger virulenten Paratyphus-C-Stamm (Hirschfeld) und zwei für den Menschen schwach pathogene Stämme (*S. gallinarum* und *S. ballerup*). Die Lipoide wurden den Bakterien durch ein früher beschriebenes Verfahren[1] entzogen und die Phosphatide durch Fällen mit Azeton bestimmt. Die Ergebnisse, in Prozent auf Trockensubstanz berechnet, sind in der folgenden Tabelle geschildert:

Stamm	Z 47	Vi-Bhatnagar	Hirschfeld	*S. gallinarum*	*S. ballerup*
Virulenz	+++	+++	++	+	+–
% azetonlöslicher Lipoide	5,01	1,29	2,85	9,48	1,01
% Phosphatide	0,14	0,21	0,81	0,57	1,07
% Gesamtlipoide	5,15	1,50	3,66	10,05	2,08

In bezug auf die Neutrallipoide könnte man aus diesen Ergebnissen keinen Zusammenhang mit Virulenz feststellen, was aber die Phosphatide anbetrifft, kann man ein deutliches Absinken mit dem Steigen der Virulenz beobachten. Nur bei *S. gallinarum* ist der Phosphatidgehalt etwas geringer. Deren Lipoide unterscheiden sich überhaupt von den Lipoiden anderer Typhusbakterien, worüber wir an einer anderen Stelle berichten werden.

Es muss hier hervorgehoben werden, dass unsere Befunde im Gegensatz mit den Tatsachen, die für säurefeste Bakterien bekannt sind, stehen, und mit der Virulenz möglicherweise nichts Gemeinschaftliches haben und vielleicht nur speziesbedingt sein könnten. Seibert, Long und Moreley[2], Martin[3], und Asselineau[4] fanden, dass virulente Stämme von *M. tuberculosis* bedeutend mehr Lipoide enthalten als nichtvirulente Stämme. Diese Unterschiede beziehen sich auf die mit Chloroform extrahierten Lipoide, die als Hauptbestandteil Mycolsäure enthalten. Auf Grund unserer bisherigen Untersuchungen kann man annehmen, dass in den azetonäther-alkohol- und chloroformlöslichen Lipoiden von Typhusbakterien derartige Lipoide nicht vorhanden sind. Die Virulenz müsste hier durch andersartig gestaltete Faktoren bedingt sein.

Es kann möglich sein, dass auch die komplex gebundenen Lipoide eine Rolle bei der Virulenz von Typhusbakterien spielen. Boivin und Mesrobeanu[5] fanden, dass die O- und Vi-Antigene eine bedeutende Menge komplex gebundener Fettsäuren enthalten, über deren Natur noch nichts Näheres bekannt ist. Wir isolierten unlängst aus den komplex gebundenen Lipoiden eines stark virulenten Stammes eine Fraktion flüssiger Fettsäuren, deren Neutralisationsäquivalent auf das Vorhandensein hochmolekularer Fettsäuren schliessen lässt und deren biologische Wirkung ebenfalls geprüft werden müsste.

S. Čmelik

Zentrales Hygienisches Institut der Universität Zagreb, Jugoslawien, den 18. April 1954.

[1] S. Čmelik, Z. physiol. Chem. *290*, 146 (1952); *293*, 222 (1953).
[2] F. B. Seibert, E. R. Long und N. Morley, J. infect. Dis. *53*, 175 (1933).
[3] G. J. Martin, J. Amer. Chem. Soc. *60*, 768 (1938).
[4] J. Asselineau, Progrès Explor. Tuberc. *5*, 20 (1952).
[5] A. Boivin und L. Mesrobeanu, C. r. Acad. Sci. *206*, 1416 (1938); C. r. Soc. Biol. *128*, 5, 9 (1938).

Summary

Researches on lipids from various strains of the *Salmonella* group showed that in the content of neutral lipids there is no difference between virulent and not virulent strains. Virulent strains contain by far less phosphatides than not virulent or weakly virulent strains.

Komplex-Stabilität und tuberkulostatische Aktivität einiger 8-Oxychinolinderivate[1,2]

Erlenmeyer, Bäumler und Roth[3] haben kürzlich eine Arbeitshypothese über den Zusammenhang zwischen Komplexbildungsvermögen und tuberkulostatischer Aktivität veröffentlicht. Wir sind auf Grund unabhängiger Versuche auf ähnliche Ergebnisse gekommen.

Wir vermuteten, dass das 8-Oxychinolin und isostere Verbindungen ihre Wirkung durch kompetitiven Antagonismus entfalten. Sie vermögen als Cu-oxinat die Co-prosthetische Gruppe eines Enzymsystemes der Mycobakterien zu stören und so das Co auszutauschen.

Die hypothetische Reaktion ist

$$\text{Enzym.Co} + \text{Oxin}_2\,\text{Cu} \rightleftarrows \text{Enzym.Cu} + \text{Oxin}_2\,\text{Co},$$

deren Gleichgewichtskonstante

$$K = \frac{[\text{Enzym. Cu}] \cdot [\text{Oxin}_2\,\text{Co}]}{[\text{Enzym. Co}] \cdot [\text{Oxin}_2\,\text{Cu}]},$$

Setzen wir nun die Stabilitätskonstanten der einzelnen Reaktionsteilnehmer ein und beachten, dass bei jeder Oxinverbindung dasselbe Enzymsystem angegriffen wird (und so das Verhältnis der Stabilitätskonstanten auch konstant bleibt), so gelangen wir zu der Gleichung

$$K = k\,\frac{K_{\text{Oxin}_2\text{Co}}}{K_{\text{Oxin}_2\text{Cu}}}.$$

Die Auswahl der zu untersuchenden Verbindungen (präparative Einzelheiten siehe[2]) geschah teils messtechnisch bedingt, teils so, dass ein möglichst grosser Bereich tuberkulostatischer Aktivität gefasst wurde.

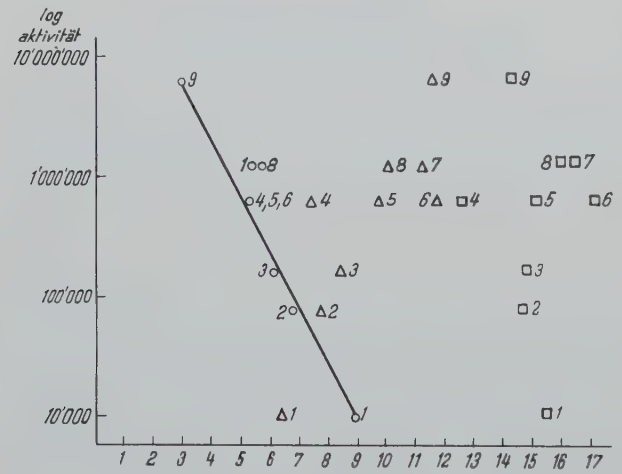
Wir bestimmten die Stabilität der Cu^{++}-Komplexe polarographisch, die der Co^{+++}-Komplexe spektrophotometrisch. Wir vermuten nämlich auf Grund der Untersuchungen von Warburg[4], dass in den Lebensvorgängen das stärker zur Komplexbildung befähigte Co^{+++}-Ion teilnimmt. Wir haben die Stabilität der Cu^{++}-Komplexe mit einem Polarographen, Typ Radiometer PO 3e, in 0,1 M KNO_3 gemessen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengefasst. Es ist interessant, zu bemerken, dass amino- und karboxylsubstituierte 8-Oxychinolin-Derivate keine Halbwellenpotential-Verschiebung verursachten; das steht im Einklang mit ihrer sehr geringen in-vitro-Aktivität.

[1] Vorgetragen an der Organisch-Chemischen Konferenz des Vereines ungarischer Chemiker, 27. September 1953.
[2] III. Mitteilung: Acta chim. Hungarica (im Druck).
[3] H. Erlenmeyer, J. Bäumler und W. Roth, Helv. chim. Acta *36*, 941 (1953).
[4] O. Warburg, *Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten* (Berlin 1946).

Nr.	Verbindung	$K_{Cu} = 10^n$	$K_{Co} = 10^m$	$K_{Co}/K_{Cu} = 10^{-x}$	In-vitro-tuberkulostatische Hemmkonzentration
1	5,7-Dijod-8-oxychinolin	15,4	6,5	8,9	Mol/10 000
2	5-Oxychinoxalin	14,6	7,8	6,8	Mol/80 000
3	5,7-Diallyl-8-oxychinolin	14,7	8,5	6,2	Mol/160 000
4	8-Oxychinolin	12,7	7,4	5,3	Mol/640 000
5	8-Oxychinolin-7-karbonsäureäthylester	15,1	9,8	5,3	Mol/640 000
6	8-Oxychinolin-7-karbonsäurehydrazid	17,1	11,8	5,3	Mol/640 000
7	7-Allyl-8-oxychinolin	16,4	11,1	5,3	Mol/1 280 000
8	5-Methyl-8-oxychinolin	16,2	10,2	5,7	Mol/1 280 000
9	Isonikotinsäurehydrazid	14,3	11,3	3,0	Mol/6 400 000

Die Konstante für den Cu-Oxin-Komplex fällt mit dem K_1-Wert von Albert *et al.*[1] zusammen. Wir müssen aber vermuten, dass unsere Konstante einen $K_1 \cdot K_2$-Wert darstellt, da die polarographische Methode unmittelbar diese liefert. Die Dissoziation des Cu-Oxin-Komplexes verläuft höchstwahrscheinlich nicht in 2 Stufen, sondern bloss in einer, da eine zweite Welle im Polarogramm nicht nachweisbar ist. Dass die Diskrepanz mit den Messungen von Albert *et al.* nicht messtechnisch bedingt ist, zeigt, dass unser mit der selben Methode gemessener Isonikotinylhydrazid-Cu-Komplexwert in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Erlenmeyer *et al.* steht.

Die Co^{+++}-Komplexstabilität konnte polarographisch nicht bestimmt werden, da das Co^{+++}-Ion nur in Gegenwart von Komplexbildnern stabil ist. Wir waren so gezwungen, die Stabilitäten spektrophotometrisch mit der Methode P. Job[2] zu bestimmen.



Die Ergebnisse, welche aus der Tabelle und seiner graphischen Darstellung ersichtlich sind, zeigen, dass die Stabilität der Cu^{++}- oder Co^{+++}-Komplexe als Funktion der tuberkulostatischen Aktivität in sich keine Regelmässigkeit aufzeigt.

Wenn wir aber die Funktion $K_{Co}{}^{+++}/K_{Cu}{}^{++}$ darstellen, so sehen wir, dass das Steigen dieses Wertes von $10^{-8,9}$ bis 10^{-3} mit dem Steigen der in-vitro-Aktivität[3] von Mol/10 000 bis Mol/6 400 000 verbunden ist. Die Ergebnisse der Messungen bestätigen somit unsere Hypothese und unterstützen experimentell auch die feineren Vorstellungen von Erlenmeyer und Mitarbeitern. Ob die Gültigkeit dieser Hypothese auch für andere Komplexbildner-Typen als 8-Oxychinolin besteht, bleibt dahingestellt.

Miklós Vajda und Tamás Nógrádi

Organisch-Chemisches Institut der L. Eötvös Universität, Budapest, und Forschungsinstitut für Pharmazeutische Industrie, Budapest, den 7. November 1953.

Summary

Based on polarographic viz. spectrophotometric determinations of the stabilities of several Cu^{++}- and Co^{+++} hydroxyquinolin complexes it has been shown that a correlation exists between the quotient of complex-stabilities $K_{Co}{}^{+++}/K_{Cu}{}^{++}$ and antitubercular activity (*cf.* table and graph). This supports the hypothesis that the 8-hydroxyquinolin derivatives and analogues act by competitive antagonism; the Cu^{++}-hydroxy-quinolates are able to replace Co in a prosthetic group of Mycobacterium-enzyme with Cu.

Purification de la pénicillinase de *Bacillus cereus*

La pénicillinase, enzyme adaptatif produit par certaines bactéries, inactive les pénicillines[1] en hydrolysant leur liaison β lactamique. La préparation de cet enzyme a été entreprise par divers investigateurs, à partir de la pénicillinase extra-cellulaire produite par des micro-organismes aérobies (*B. subtilis, B. cereus, B. licheniformis*)[2].

Sa purification partielle fut obtenue par application de méthodes diverses:

- concentration par dialyse de deux jours, à froid[3],
- adsorption sur Filter Cel, puis élution en milieu ammoniacal[4],
- précipitations isoélectriques, et relargage par le sulfate d'ammonium[5].

[1] A. Albert, M. J. Gibson, S. D. Rubbo, Brit. J. exp. Pathol. *31*, 425 (1950), und *34*, 119 (1953).

[2] P. Job, Ann. Chim. *9*, 113 (1928).

[3] Die in-vitro-Aktivität wurde auf dem $H_{37}Rv$-Stamm in Duboschem Nährmedium durch das Mikrobiologische Institut der Universität Szeged ermittelt, wofür wir Herrn Prof. Dr. G. Ivánovics und Herrn Dr. I. Koczka auch an dieser Stelle Dank sagen.

[1] E. P. Abraham, *The Enzymes*, Vol. I, part. 2, chap. 37 (Academic Press Inc., New-York 19..), p. 1170.

[2] J. Ungar, Nature *154*, 236 (1944). – E. S. Duthie, J. Gen. physiol. *1*, 370 (1947).

[3] R. G. Benedict, W. H. Schmidt et R. D. Coghill, Arch. Biochem. *8*, 377 (1945).

[4] R. D. Housewright et R. J. Henry, J. Biol. Chem. *167*, 553 (1947). – G. A. Lepage, J. F. Morgan et M. E. Campbell, J. Biol. Chem. *166*, 465 (1946).

[5] J. F. Morgan et M. E. Campell, J. Biol. Chem. *169*, 377 (1947).

Il est difficile de comparer la pureté des fractions obtenues, car l'unité de pénicillinase n'était pas définie de la même façon par les divers auteurs.

Nous avons adopté une unité de pénicillinase analogue à celle que Gabor B. Lévy[1], H. Pénau et coll.[2] ont définie. Cette unité est la mieux adaptée aux méthodes de dosages iodométrique[2] et spectrophotométrique[3] que nous avons appliquées.

Nous avons préparé la pénicillinase par culture de *Bacillus cereus*, (NRRL B 569), en milieu à base de glucose, peptone, chlorure de sodium, en fioles de Fernbach agitées à 24°C. L'addition fractionnée, en cours de culture, de doses croissantes de benzylpénicilline, provoque l'augmentation de la sécrétion de l'enzyme; celle-ci atteint son maximum vers la 48e heure, et diminue ensuite rapidement. Le titre varie de 5000 à 18000 unités pénicillinase par cm³.

Les premiers stades de notre méthode de fractionnement ont déjà été brièvement décrits[4]. Nous résumons ci-dessous notre méthode de purification de la pénicillinase:

I. – Le bouillon de culture centrifugé, refroidi à 2°C, est additionné lentement de 2 volumes d'acétone refroidie à −10°C. Le précipité est séparé par centrifugation à −10°C, après 30 min. Par dessiccation sous vide à froid, on obtient une poudre sèche, dite «poudre acétonique», dans laquelle on retrouve 50% de l'activité initiale: un activateur de la pénicillinase est en effet éliminé dans la solution hydroacétonique, mais la totalité de l'enzyme est pratiquement présente dans le floculat.

II. – La «poudre acétonique» est mise en suspension dans un tampon acétique pH 5,1 (CH_3CO_2Na M 2,5 parties + CH_3CO_2H M 1,0 partie), à raison de 10 cm³ pour 1 g. Après agitation de 60 min à 37°C, la suspension est centrifugée et le culot est éliminé.

Bien que l'activité de la poudre acétonique soit pratiquement stable pendant plusieurs mois, une poudre fraîchement préparée se solubilise plus complètement dans le tampon acétique qu'une poudre plus ancienne, pour laquelle une perte d'activité d'environ 30% peut être observée à ce stade, dans le culot de centrifugation.

III. – La solution est amenée à 0,43 de saturation en sulfate d'ammonium, par addition de la quantité convenable de solution aqueuse saturée de ce sel. Après centrifugation, le culot est éliminé.

IV. – La solution est amenée à 0,60 de saturation en sulfate d'ammonium, comme ci-dessus. Après centrifugation, le culot est lavé par remise en suspension dans une solution aqueuse de sulfate d'ammonium à 0,60 de saturation, puis centrifugé.

Le culot final est éliminé.

V. – La solution est amenée à 0,70 de saturation en sulfate d'ammonium, comme ci-dessus. Après centrifugation, le culot est débarrassé de cristaux de sulfate de calcium par trois lavages successifs avec une solution aqueuse saturée de sulfate d'ammonium. Il peut être conservé à ce stade en vue d'une purification ultérieure.

VI. – La solution est amenée à 0,88 de saturation, par addition, cette fois, de sulfate d'ammonium cristallisé. Le culot séparé par centrifugation renferme 50% de l'activité initiale; il est débarrassé de sulfate de calcium par trois lavages successifs avec une solution aqueuse saturée de sulfate d'ammonium. La solution est éliminée.

VII. – Les ions SO^{-4} de la solution aqueuse du culot VI lavé (titre: 200000 unités par cm³) sont échangés contre des ions CH_3COO^- par échangeur d'anions Amberlite IR 4 B. Cette opération s'effectue sans perte d'activité.

VIII. – La solution est additionnée de 2 volumes d'acétone à −10°C; après 20 min de floculation à −10°C, le précipité est séparé par centrifugation à −6°C et lavé par de l'acétone à 66%, refroidie à −10°C. Il est finalement dissous dans de l'eau distillée, et séché à l'état congelé (lyophilisation). Une perte apparente d'activité est due à l'élimination d'un activateur, soluble dans l'acétone à 66%, et probablement identique à celui qui est éliminé au stade I.

Le tableau suivant précise la pureté des fractions (exprimée par l'activité rapportée à 1 mg d'azote total (A_{N_t}) et à 1 mg d'azote protéique (A_{N_p}) et le rendement obtenu à chaque stade.

Table

Stades Opératoires	A_{N_t}	A_{N_t}	Rendements %
I	25 000		100
II			90–95
III			85
IV	180 000	320 000	75–80
V	400 000	650 000	25–30
VI	500 000	1 200 000 à 1 500 000	50
VII			
VIII	500 000 à 700 000	500 000 à 700 000	25–30

L'azote total N_t est titré par microkjeldhal, l'azote ammoniacal des prises étant éliminé avant la désagrégation organique par un entraînement à la vapeur en présence de magnésie.

L'azote protéique N_p est déterminé par microkjeldhal sur le précipité obtenu en traitant un volume de la prise d'essai par un volume d'acide trichloracétique à 20%, et après lavage par une solution à 10% du même acide.

La fraction obtenue au stade VIII peut être considérée comme une pénicillinase très purifiée; elle donne des cristaux dans une solution de sulfate d'ammonium, à froid; les propriétés de cette fraction ainsi que les détails sur sa cristallisation seront publiés ultérieurement.

La pénicillinase de *Bacillus cereus* est très stable jusqu'au stade V, le précipité V présentant même, en solution, une certaine activation.

Par contre, la fraction obtenue au cours du stade VI est très instable; en effet, des solutions de concentrations diverses entre pH 5,5 et 6,8 se désactivent de 50% en 24 h. Les solutions de pénicillinase du stade VIII (pénicillinase purifiée) sont plus stables.

La pénicillinase du stade I se désactive au cours des dialyses contre de l'eau distillée ou permutée; le dialysat ne réactive pas l'enzyme. La rapidité de la désactivation dépend de la porosité de la membrane semi-perméable utilisée.

L'activateur présent dans les solutions acétoniques (stade I) est complexe. Une fraction organique est responsable d'une partie de l'effet; un métal (autre que Ca^{++}) de l'autre partie. Le complexe activateur est présent dans les peptones du bouillon de culture de *Bacillus cereus*. Le Cl^- n'a aucun effet activateur.

[1] Gabor B. Levy, Nature *166*, 740 (1950).

[2] H. Pénau, J. Philippe et D. Benoist, Ann. Pharm. Fr. *9*, 419 (1951).

[3] P. Baudet et E. Cherbuliez, Helv. chim. Acta *36*, 2056 (1953).

[4] G. Hagemann, P. Baudet, W. Tsin, D. Benoist, résumé des communications du IIe Congrès international de Biochimie, Paris, juillet 1952, p. 246.

La pénicillinase purifiée (VIII) présente un pH situé entre 4,8 et 5,2. Elle se dénature lentement (insolubilisation irréversible) dans la limite de ces pH. Les protéines de la fraction VI et de la fraction VIII représentent environ 1% et 0,5% respectivement du poids de la poudre acétonique (stade I).

On peut augmenter le rendement en produit purifié (A_{N_t} = 500000 à 700000) en reprenant la fraction insoluble du stade V dans du sulfate d'ammonium à 0,60 de saturation et la fractionner à nouveau par addition de sulfate d'ammonium en solution saturée.

La présence d'une quantité notable de Ca^{++} (provenant de la peptone bactériologique UCLAF, Romainville, Seine, France, utilisée pour la production de la pénicillinase) dans la poudre acétonique (stade I) détermine pour une part la qualité du fractionnement. Il semble que la solubilité de l'enzyme dans le sulfate d'ammonium soit augmentée de ce fait, facilitant ainsi sa purification.

La méthode de purification de la pénicillinase de *Bacillus cereus* que nous venons d'exposer permet d'obtenir l'enzyme sous une forme très purifiée, avec des rendements élevés.

P. Baudet et G. Hagemann

Laboratoire de Chimie organique et pharmaceutique, Ecole de Chimie, Genève (Suisse) et Laboratoires de Recherches Roussel-Sofrapen, Romainville, Seine (France), le 24 février 1954.

Summary

A method for purification of Penicillinase from *Bacillus cereus* is described whereby we obtain the enzyme in a very pure form and in excellent yields. Starting from a crude acetone precipitate, the purification is obtained by using successive separations with ammonium sulphate, in controlled conditions, and final ion exchange.

Spezifische Wirkung einiger tierischer und bakterieller Polysaccharide auf Leucocyten *in vitro*

Nachdem es gelungen war, in Fraktionen von Proteuskulturen[1], die Kahnt in unserer chemischen Abteilung bearbeitet hat, solche zu finden, die in Konzentrationen bis zu 10^{-8} eine starke emigrationsfördernde Wirkung auf Leucocyten ausüben, schien es interessant, in der Literatur beschriebene, zum Teil hochgereinigte polysaccharidartige Bakterienprodukte und analoge Gewebefaktoren zu prüfen. Dank dem Entgegenkommen verschiedener Forscher konnten wir eine grössere Reihe derartiger Stoffe untersuchen: Polysaccharide, Mucopolysaccharide, Phosphatide und einzelne Kohlehydratsulfosäuren.

Arbeiten über die Wirkung von Bakterienextrakten auf die Emigration von Leucocyten *in vitro* ergeben nur wenige Befunde. Meier[2] hat den Nachweis chemotaktisch wirksamer Produkte in Bakterienkulturen erbracht[3]. Lasfargues[4] beschreibt Emigrationsförderung mit cytotoxischen, hitzelabilen Fraktionen aus grampositiven Bakterien. Kuna und Chambers[5] erwähnen eine 1%-Endotoxinlösung aus pyrogenen Bakterien als chemotaktisch wirksam (siehe auch zusammenfassende Arbeit von McCutcheon[1]). Chemotaxis wie planimetrisch erfasste Leucocytenemigration charakterisieren offenbar die gleiche Wirkung.

Für *Fibroblasten* sind alle untersuchten Substanzen, mit Ausnahme von Pyromen (Ampullenware), bei kurzer Einwirkungsdauer wenig wirksame Produkte. Eine morphologisch sichtbare Schädigung der Mitosen und Interphasenzelle liess sich nicht nachweisen. Über Einzelheiten wird später in anderem Zusammenhang berichtet. Das Ergebnis der *Leucocyten*versuche zeigt eindeutig, dass unter den geprüften Substanzgruppen nur eine Gruppe eine ausserordentlich hohe spezifische Wirkung auf Wanderzellen ausübt. Die Polysaccharide aus *S. marcescens*, Shiga und Proteus wirken über einen breiten Konzentrationsbereich wanderungsfördernd, wobei mit abnehmender Konzentration die Wirkungsstärke zuerst zunimmt, nach Erreichung eines charakterisierten Maximums (im Mittel bei 10^{-6} g/cm^3) fällt die Wirkung mit weiterer Konzentrationsabnahme zum Werte der Kontrolle wieder ab. Lipopolysaccharide und Phosphatide aus Mycobakterien zeigen im Vergleich mit den Polysacchariden aus gramnegativen Keimen keine oder nur geringe Wirksamkeit (siehe dazu Wartman und Ingraham[2]).

Mucin, Mucopolysaccharid und Mucoprotein haben keine Wirkung auf die Auswanderung; Chondroitinschwefelsäureester und Polysaccharid A (Heparin) zeigen eine mässig fördernde Wirkung. Heparin[3] wirkt an menschlichen Leucocyten nur unter besonderen Versuchsbedingungen. Nach Chambers ist es 1%ig ohne Wirkung. Schwangernharnextrakt[4] ist die wirksamste der geprüften «körpereigenen» Substanzen. Auf Grund der vorliegenden Befunde lassen sich folgende, allgemeine Schlussfolgerungen ziehen. Nur bestimmte Bakterien-Polysaccharide sind emigrationsfördernd hochwirksam. Dass sowohl Shigaantigen wie Polysaccharid wirken, spricht dafür, dass zum mindesten Teilkomponenten beider Stoffe identisch sein müssen. Ob die Unterschiede zwischen Extrakten aus gramnegativen Bazillen und Mycobakterien bereits so zu deuten sind, dass nur die Bakterien, die auch lebend chemotaktische Wirksamkeit besitzen, die hier nachgewiesenen Stoffe enthalten, während Tuberkelbazillen, die lebend diese Wirkung nicht haben, solche nicht besitzen, mag vorläufig dahingestellt bleiben. Die ausserordentlich hohe Wirksamkeit von Polysacchariden aus gramnegativen Keimen, verglichen mit der relativ geringen oder fehlenden Wirksamkeit anderer «Mucopolysaccharide», lässt annehmen, dass es sich bei den wirksamen Stoffen um andersgeartete chemische Individuen handeln muss.

Wegen der Konzentrationswirkungsverhältnisse ist anzunehmen, dass für die Verhältnisse bei Infektion im Gewebe nur die hochwirksamen Bakterienstoffe und analoge Stoffe als massgebend für direkte chemotaktische Wirkung in Frage kommen.

Wir sind verschiedenen Forschern, Prof. W. P. J. Morgan, Dr. M. J. Shear, Dr. E. Lederer, Dr. J. F. McCrea, Dr. A. Gottschalk, Dr. H. Smith, für die Zurverfügungstellung von Substanzen, die diese Untersuchung ermöglicht hat, zu grösstem Dank verpflichtet.

R. Meier und B. Schär

Wissenschaftliche Laboratorien der Ciba-Aktiengesellschaft Basel, den 15. Juli 1954.

[1] R. Meier und B. Schär, Exper. *9*, 93 (1953).
[2] R. Meier, Z. exp. Med. *87*, 283 (1933).
[3] R. Meier, Helv. chim. Acta *24*, 134E (1941).
[4] E. Lasfargues, Rev. Immunol. *10*, 45 (1946).
[5] A. Kuna und R. Chambers, J. Clin. Invest. *32*, 436 (1953).

[1] M. McCutcheon, Phys. Rev. *26*, 319 (1946).
[2] W. B. Wartman und E. S. Ingraham, Arch. Path. *29*, 773 (1940).
[3] M. Allgöwer, Schweiz. med. Wschr. *77*, 131 (1947).
[4] R. Meier und B. Schär, Exper. *7*, 308 (1951).

	Hersteller	Präparate		Wirkung an Fibroblasten 8h	Wirkung auf die Auswanderung von Leucocyten (16h)					
				10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
Stoffe bakterieller Herkunft	Kahnt	Proteus-Polysaccharid-Fraktion		∅			+	+	+	+
	Shear	*S. marcescens*, Polysaccharid		∅		+	+	+	+	∅
	Morgan	Shiga specific Polysaccharide		∅			+	+	+	∅
		Shiga full antigen		∅			+	+	+	+
	Travenol Labs.	Pyromen		toxisch 10^{-6}			−	±	+	(+)
	Lederer	Lipopolysaccharide	aus Brévannes		−	∅				
			aus BCG			∅				
		Phosphatide	aus $H_{37}Rv$ Tb	∅	+	+	∅			
			aus Brévannes		+	∅	∅			
			aus M. phlei	∅	−	+	∅			
			aus M. smegmat	∅	−	−	∅			
Stoffe tierischer Herkunft	Benz	Schwangernharnextrakt		∅	+	+	+	∅		
	Meyer	Chondroitinschwefelsäureester			+	+	∅			
	Smith	Polysaccharid A (Heparin)			+	+	∅			
		Bloodgroup substances	High A, Low H		+	∅				
			Low A, High H		∅	∅				
	Herrmann	Gastric Mucin Polysaccharid			−	∅				
	McCrea	Sheep Salivary Mucoid			∅	∅	∅			
	Gottschalk	Virus Receptor aus Speicheldrüsen		∅	∅	∅	∅			

Legende: + Förderung der Leucocytenemigration; − Hemmung der Leucocytenemigration; ∅ keine Wirkung.

Summary

Different purified polysaccharides, mucopolysaccharides, phosphatides and carbohydrat-sulfonic acids have been investigated for their effect on stimulation of leucocytic migration *in vitro*. The bacterial polysaccharides of proteus, *S. marcescens*, shiga and shiga fullantigen, have been found to be of high specific activity. All other compounds have much less or no activity. Therefore it might be concluded that the type of bacterial polysaccharides which promote leucocytic migration belong to a highly specific group.

X-Ray Inactivation of Saccharomyces During the Budding Cycle

A previous study of ultraviolet inactivation of baker's yeast during the budding cycle[1] established biological referents for all aspects of the ultraviolet survival curve. It was shown that the target value and rate of logarithmic inactivation are related to the desoxyribosenucleic acid (DNA) content of the cell and that the length of the shoulder portion of the curve prior to the onset of logarithmic inactivation is conditioned by the nucleoplasm/cytoplasm ratio. The remarkably great resistance of baker's yeast to X-rays made difficult the extension of such an analysis to the X-ray survival curve. However, conditions have been determined for obtaining the comparatively sensitive tetraploid yeast, 11294 × 11296, of the Carbondale Breeding Stocks in an unbudded condition so that the first budding cycle proceeds in good synchrony.

Cells were grown for 48 h at 30°C in 25 ml of the following broth contained in a 250 ml flask: Budweiser liquid yeast extract, 25 ml; glucose, 30 g; KH_2PO_4, 2 g; $MgSO_4$, 0·5 g; distilled water to 1 l. Following incubation the culture exhibited less than 5 per cent budding and each cell possessed a complement of numerous prominent mitochondria indicating physiologic quiescence. In order to obtain yeast populations at various stages of

[1] A. Sarachek, Exptl. Cell Res. *6*, 45 (1954).

the budding cycle, the non growing cells were added to fresh nutrient and shaken at 30°C. After 50–55 min incubation, the first small buds arose. The first budding cycle was completed by 125 to 130 min incubation.

Microscopic examination revealed that budding begins in good synchrony; 70–85 per cent of the cells showing small buds between 55 and 75 min. The rate at which the buds developed after their initial appearance was quite variable throughout the remainder of the cycle. However, since the DNA content of the cell doubles with the inception of budding[1], it was assumed that, regardless of variations in the size of buds during growth, an essentially synchronous series of nuclear changes was being examined.

For irradiation, cells were harvested after various periods of incubation, washed once in M/15 KH_2PO_4 and resuspended in M/15 KH_2PO_4 to a concentration of approximately 5×10^5 cells/ml. Forty milliliters of the suspension contained in a sterile petri dish was irradiated at a rate of 1000 r/min with radiation emitted by a tungsten target tube operating at 180 KV/20 ma, 2 mm AL total filtration. Survival determinations were made by plating in a medium consisting of the broth described above solidified by the addition of 2 per cent agar.

Table

Time of Incubation	Target Values	Inactivation Rates
min		
0	3·5	0·101
55	1	0·037
75	1	0·027
90	1	0·035
120	1	0·042
135	1	0·042

Changes in the target values and inactivation rates over the course of a single budding cycle.

Control interphase cells yield sigmoid multitarget survival curves with an average target value of about 3·5 and a rate of logarithmic inactivation of 0·101 (Table). However, the survival curves of cells throughout the entire budding cycle are exponential (target value 1). At the inception of budding the rate of logarithmic inactivation decreases markedly with respect to that of the control. After 55 min incubation, the inactivation rate drops to 0·037 and after 75 min incubation drops still further to 0·027. By 90 min incubation, the inactivation rate rises to the value observed at 55 min and remains at that level until 120 min at which time it rises again to 0·042. Between 120 and 135 min incubation, when the second budding cycle is about to commence, no significant change occurs in the X-ray sensitivity of the cells.

These results agree well with the earlier studies by Darlington and LaCour[2] of the relation between chromosome breakage and the nucleic acid cycle. These workers demonstrated that the accretion of nucleotides by chromosomal structures rendered these elements resistant to breakage by X-rays. It is observed here that as nucleotides are produced during the early phases of the budding process, the resistance of the yeast cell to X-ray inactivation greatly increases, and that as dechromatinization of the chromosomal structures occurs during the middle and later phases of the budding cycle the cellular resistance to inactivation decreases. The fact that the inactivation rate at the completion of the budding cycle does not fall to a value equal to that of the original interphase cells, together with the observation that the survival curve does not return to a sigmoid form, may reflect the fact that complete dechromatinization does not occur in cells of an actively dividing population.

These observations provide additional support for the earlier presumptive evidence[1] indicating that the inactivation of yeast cells by X-rays is in large part a consequence of the induction of chromosomal aberrations.

This work has been supported by research grants from the U.S. Atomic Energy Commission and the Office of Naval Research NR 164–140.

A. Sarachek

Biological Research Laboratory, Southern Illinois University Carbondale, Illinois, March 3, 1954.

Zusammenfassung

Es wurde die Beeinflussungsmöglichkeit der tetraploiden Hefezellen durch Röntgenstrahlungsinaktivierung während besonderer Stadien der Keimungsdauer untersucht. Das Kurvenbild der überlebenden, nichtkeimenden interphasen Zellen ist sigmaförmig und ergibt einen Zielwert 4 (target value 4). Die Kurvenbilder der Zellen sind während aller Phasen der Keimungsdauer exponential. Nichtkeimende Zellen zeigen der Inaktivierung gegenüber ein Mindestmass an Widerstand, Zellen im Mittelpunkt der Keimungsdauer ein Höchstmass an Widerstand. Aus diesen Versuchen darf man schliessen, dass eine Wechselbeziehung zwischen der Röntgenstrahlungssensibilität der Zellen und des Kernsäurezyklus während der Mitose besteht.

[1] A. Sarachek, and W. H. Lucke, Exper. *9*, 374 (1953).

Der Einfluss der Pantothensäure, des Pantethins und des phosphorylierten Pantethins auf die Carotinbildung bei *Mucor hiemalis*

Die Pantothensäure ist als wesentlicher Bestandteil im Coenzym A eingebaut. Wie man weiss, spielt das Coenzym A bei den Acetylierungsreaktionen eine wichtige Rolle.

Unsere bisherigen Arbeiten über die Biosynthese der Carotinoide haben ergeben, dass die Essigsäure als eine primitive Vorstufe der Carotinoide anzusprechen ist[1]. Somit stellt sich die Frage, ob das Coenzym A nicht auch die Bildung der Carotinoide beeinflussen würde, wie dies auch schon Arnaki und Stary[2] angedeutet haben.

Über die ersten Ergebnisse der Experimente mit Pantothensäure, Pantethin und phosphoryliertem Pantethin, welche im Coenzym A (siehe Konstitutionsformel) eingebaut sind, soll hier kurz berichtet werden. Es standen uns Präparate von Pantethin und phosphoryliertem

[1] M. Ogur, S. Minckler, and D. O. McClary, J. Bact. *66*, 642 (1953).

[2] C. D. Darlington, and L. F. LaCour, J. Genetics *46*, 180 (1945).

[1] E. C. Grob, W. H. Schopfer und G. G. Poretti, Int. Z. Vitaminforschg. *23*, 484 (1952). – E. C. Grob und R. Bütler, Exper. *10*, 250 (1954).

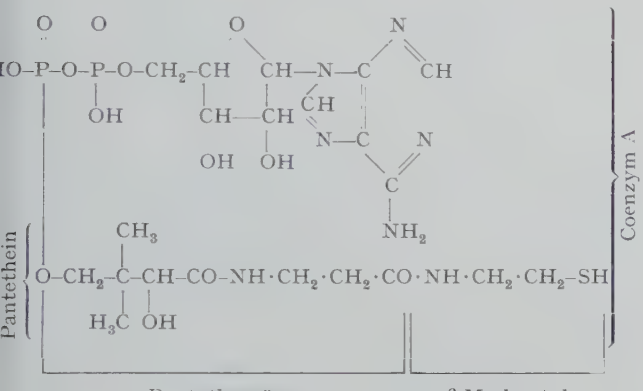
[2] M. Arnaki und Z. Stary, Biochem. Z. *323*, 367 (1952).

Tabelle

Tage	Wirksubstanz	Kontrolle	50 mγ pro 25 cm³ NL	500 mγ pro 25 cm³ NL	1000 mγ pro 25 cm³ NL
4	Pantothensäure	100%	108%	109%	117%
	Pantethin	100%	130%	124%	111%
6	Pantothensäure	—	—	—	-
	Pantethin	100%	99%	94%	96%
8	Pantothensäure	100%	123%	135%	129%
	Pantethin	100%	107%	94%	95%
10	Pantothensäure	—	—	—	—
	Pantethin	100%	109%	104%	99%
12	Pantothensäure	100%	112%	117%	101%
	Pantethin	100%	101%	97%	100%
14	Pantothensäure	100%	112%	113%	113%
	Pantethin	—	—	—	—

Pantethin zur Verfügung, die auf synthetischem Wege[1] erhalten worden sind[2].

Alle Kulturen des *Mucor hiemalis* sind auf einem Nährmilieu mit Na-Acetat als einziger Kohlenstoffquelle gezüchtet worden[3]. Die Tabelle zeigt die wichtigsten der bis heute erhaltenen Ergebnisse.



Wir stellen fest, dass:

1. *die Pantothensäure* am 8. Tag der Kulturdauer die Carotinbildung maximal (35%) fördert mit 500 mγ Pantothensäure pro 25 cm³ Nährlösung. Die entsprechenden Tabellenwerte sind gegenüber dem Kontrollwert 100% (ohne Pantothensäure) statistisch gesichert. Bei jüngeren Kulturen haben wir keine signifikante Stimulierung der Carotinbildung feststellen können. Bei Kulturen, die älter sind als 8 Tage, beobachten wir eine Abnahme der Pantothensäurewirkung.

2. *beim Pantethin* schon am 4. Tage der Kulturdauer 50 mγ Pantethin pro 25 cm³ Nährlösung, die maximale Wirkung von 30% erreicht wird. Auch dieser Wert konnte statistisch gesichert werden. Mit zunehmendem Alter der Kulturen nimmt die fördernde Wirkung des Pantethins auch ab.

Den bisherigen Ergebnissen nach zu schliessen, findet sich die carotinbildende Wirkung auch beim phosphorylierten Pantethin, wenn auch weniger stark ausgeprägt. Entgegen den bei Pantothensäure und Pantethin gemachten Beobachtungen, erstreckt sich die fördernde Wirkung des phosphorylierten Pantethins über die ganze Kulturdauer (4 bis 14 Tage).

Diese Arbeit ist mit Unterstützung der «Fritz-Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz» ausgeführt worden, der wir unseren besten Dank aussprechen.

E. C. Grob, Frl. V. Grundbacher
und W. H. Schopfer

Botanisches Institut der Universität Bern, den 17. Juli 1954.

Summary

Pantothenic acid, pantethine, and probably also phosphorylated pantethine stimulate the production of carotenoids by the fungus *Mucor hiemalis*.

[1] M. Viscontini, K. Adank, N. Merkling, K. Ehrhard und P. Karrer, Helv. chim. Acta *36*, 836 (1953); *37*, 375 (1954).

[2] Diese Präparate sind uns in freundlicher Weise von Herrn Prof. Viscontini, Zürich, überlassen worden.

[3] W. H. Schopfer und E. C. Grob, Exper. *8*, 140 (1952).

Sur la caractérisation de dérivés guanidiques d'origine biologique par électrophorèse et chromatographie sur papier (chromatoélectrophorèse)

La chromatographie sur papier des dérivés guanidiques[1] permet d'analyser des mélanges de ceux-ci, grâce à l'emploi de divers solvants en une ou en deux dimensions. Nous nous sommes proposé d'associer dans le même but la chromatographie monodimensionelle à l'électrophorèse, réalisées perpendiculairement l'une à l'autre sur une même feuille de papier. Les propriétés des corps étudiés sur lesquelles reposent ces deux opérations étant différentes, on pouvait espérer tirer de leur application successive des informations particulièrement précises, et cela dans un temps beaucoup plus bref que celui exigé par la chromatographie bidimensionnelle. Un travail poursuivi indépendamment du nôtre au moyen d'une technique du même ordre a, d'ailleurs, déjà montré l'efficacité de la chromatoélectrophorèse dans le cas de mélanges d'amines[2].

[1] J. Roche, Nguyen-van Thoai, W. Felix et Y. Robin, C. r. Acad. Sci. *223*, 1688 (1951). – J. Roche, Nguyen-van Thoai et J. L. Hatt, Biochim. biophys. Acta *14*, 71 (1954).

[2] J. Blass, M. Macheboeuf et P. Rebeyrotte, Bull. Soc. Chim. biol. *35*, 953 (1953).

Tableau

Migration électrophorétique (pH = 8,6, 300 V, 0,4 mA/cm, 2 h, t° = + 10°), R_f (papier Arches 302); solvants: 1° *n*-butanol, acide acétique, eau (73:10:17), 2° pyridine, isopentanol, acide acétique, eau (80:40:10:40) de divers dérivés guanidiques et de la citrulline et réactions colorées données par leurs taches[1].

Corps étudié	Migration électrophorétique (cm)	R_f		Réactions colorées		
		n-butanol	pyridine	de Sakaguchi	à l'α-naphtol diacétyle	à la ninhydrine
1° Citrulline	3,20	0,12	0,24	–	–	–
2° Glycocyamine	3,85	0,25	0,31	+	+	–
3° Créatine	4,00	0,23	0,31	–	+ + +	–
4° Acide γ-guanidobutyrique	4,00	0,49	0,55	+	+	–
5° Arginine	8,05	0,13	0,22	+	+	+
6° Arcaïne	10,70	0,22	0,42	+	+	–
7° Diméthylguanidine	12,85	0,40	0,60	–	+ + +	–
8° Agmatine	13,00	0,13	0,34	+	+	+
9° Méthylguanidine	13,9	0,40	0,57	+	+	–
10° Guanidine	14,9	0,33	0,47	–	+ + +	–
11° Octopine	–	0,05	0,21	+	+	–

[1] Les réactions colorées indiquées sont opérées selon les modalités décrites dans [2] pour celles de Sakaguchi et à l'α-naphtol-diacétyle et par pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 0,1% dans l'acétone.

[2] J. Roche, Nguyen-van Thoai, W. Felix et Y. Robin, C. r. Acad. Sci. *223*, 1688 (1951). – J. Roche, Nguyen-van Thoai et J. L. Hatt, Biochim. biophys. Acta *14*, 71 (1954).

Techniques. On réalise dans un premier temps une chromatographie en une dimension à + 15°C, sur papier Arches 302 (migration du solvant sur 20 cm). Après séchage à l'air chaud pour éliminer le solvant, on imprègne la feuille d'une solution tampon au véronal de pH = 8,6 et de force ionique 0,1, puis on la soumet à l'électrophorèse[1]. Celle-ci est opérée sous 300 V et 0,4 mA/cm, perpendiculairement à la direction de la chromatographie préalable (passage du courant pendant 2 h à + 10°C sur la bande de papier, d'une longueur utile de 20 cm, déposée horizontalement dans la cuve de l'appareil). Les taches sont révélées au moyen de diverses réactions colorées, après séchage du papier à l'air chaud (réaction à la ninhydrine pour les acides α-aminés et l'agmatine, réaction de Sakaguchi pour les guanidines monosubstituées, réaction au diacétyle-α-naphtol pour la guanidine et l'ensemble de ses dérivés, réaction au *p*-diméthylaminobenzaldéhyde pour la citrulline[2]).

Applications et résultats. L'examen du Tableau I rend compte des résultats obtenus dans l'application de la chromatographie et de l'électrophorèse monodimensionnelles sur papier à l'étude de divers dérivés guanidiques. Les opérations ont été réalisées dans les conditions indiquées plus haut, à ceci près que la détermination des R_f a été faite après migration des solvants de 45–50 cm.

L'électrophorèse sur papier permet de séparer en 2 h sur 20 cm tous les composés étudiés, sauf la glycocyamine, la créatine et l'acide-γ-guanidobutyrique, dont les pH_i sont très voisins. La citrulline peut être distinguée de ces derniers, dont la migration est peu différente, grâce à sa réaction spécifique au *p*-diméthylaminobenzaldéhyde (solution à 1% dans l'acétone additionnée de 10% HCl). Les R_f indiqués sont analogues à ceux obtenus antérieurement sur d'autres papiers[1]. Le mélange de pyridine, d'isopentanol, d'acide acétique et d'eau (80:40:10:40), constitue dans la plupart des cas le solvant le plus efficace; il convient toutefois de lui préférer le mélange de *n*-butanol, d'acide formique et d'eau (63:20:17) pour séparer la glycocyamine de la créatine.

L'association de la chromatographie à l'électrophorèse conduit à une résolution satisfaisante de mélanges de dérivés guanidiques en 8 h. On la réalise sur une feuille de papier carrée (30 × 30 cm). Une tache de la solution est chromatographiée par une migration du solvant sur une longueur de 20 cm, ce qui demande environ 6 h à + 15°C. Le papier est ensuite séché sous un courant d'air chaud, puis imprégné d'une solution tampon au véronal (pH = 8,6; force ionique = 0,1), dont l'excès est, s'il y a lieu, éliminé par séchage entre deux feuilles de papier filtre. On soumet alors le chromatogramme ainsi humecté (non révélé) à l'action d'un champ électrique, perpendiculairement au sens dans lequel a été opérée la migration initiale du solvant. Après 2 h, on retire le papier de la cuve à électrophorèse, maintenue à + 10°C pendant toute la durée de l'opération; on le sèche à l'air chaud et l'on révèle les taches aux diverses réactions colorées indiquées plus haut[2]. On opère successivement dans ce but les réactions à la ninhydrine, de Sakaguchi et au diacétyl-α-naphtol – et, accessoirement, celle au *p*-diméthylaminobenzaldéhyde – par pulvérisation de réactifs ou, mieux, par la technique de Jepson et Smith[3].

[1] Appareil du type décrit par W. Grassman, K. Hannig et D. Knedel, Dtsch. med. Wschr. *76*, 333 (1951).

[2] J. Roche, Nguyen-van Thoai, W. Felix et Y. Robin, C. r. Acad. Sci. *223*, 1688 (1951). – J. Roche, Nguyen-van Thoai te J. L. Hatt, Biochim. biophys. Acta (1954) (sous presse). – R. Acher et C. Crocker, Biochim. biophys. Acta *9*, 704 (1952). – C. F. Dent, Biochem. J. *43*, 169 (1948). – J. B. Jepson et I. Smith, Nature *171*, 4B (1953); *172*, 1100 (1953). – G. Toennies et J. J. Kolb, Anal. Chem. *23*, 823 (1951).

[1] J. Roche, Nguyen-van Thoai, W. Felix et Y. Robin, C. r. Acad. Sci. *223*, 1688 (1951). – J. Roche, Nguyen-van Thoai et J. L. Hatt, Biochim. biophys. Acta *14*, 71 (1954).

[2] J. Roche, Nguyen-van Thoai, W. Felix et Y. Robin, C. r. Acad. Sci. *223*, 1688 (1951). – J. Roche, Nguyen-van Thoai et J. L. Hatt, Biochim. biophys. Acta (1954) (sous presse). – R. Acher et C. Crocker, Biochim. biophys. Acta *9*, 704 (1952). – C. F. Dent, Biochem. J. *43*, 169 (1948). – J. B. Jepson et I. Smith, Nature *171*, 4B (1953); *172*, 1100 (1953). – G. Toennies et J. J. Kolb, Anal. Chem. *23*, 823 (1951).

[3] R. Acher et C. Crocker, Biochim. biophys. Acta *9*, 704 (1952). – C. F. Dent, Biochem. J. *43*, 169 (1948). – J. B. Jepson et I. Smith, Nature *171*, 4B (1953); *172*, 1100 (1953). – G. Toennies et J. J. Kolb, Anal. Chem. *23*, 823 (1951).

Les Figures 1 et 2 reproduisent des décalques de taches obtenues au cours de deux chromatoélectrophorèses des dérivés étudiés, réalisées chacune avec un solvant chromatographique différent dans leur premier temps. Nous avons joint à l'un d'eux (Figure 1, *A*), aux fins de comparaison, un document rendant compte de la migration électrophorétique des mêmes corps non soumis à une chromatographie préalable.

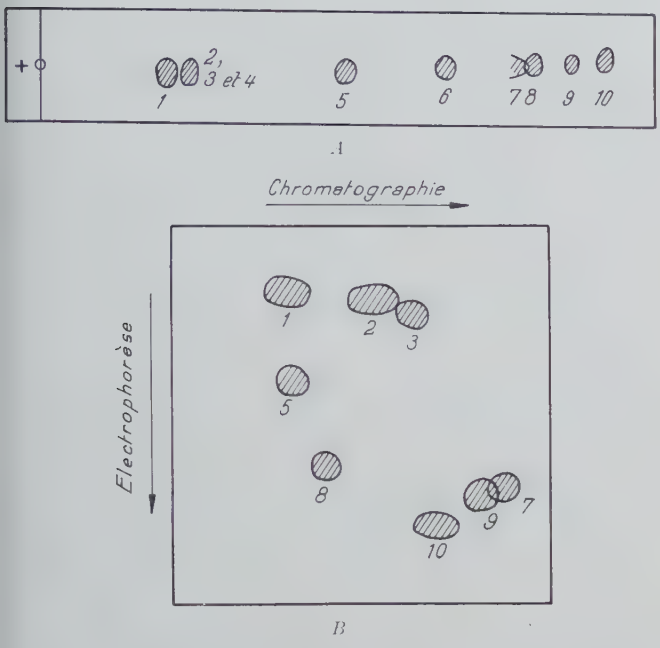


Fig. 1. *A*.–Migration électrophorétique sur papier de divers dérivés guanidiques et de la citrulline (tampon au véronal de pH = 8,6 et de force ionique 0,1; 300 V, 0,4 mA/cm, 2 h, + 10°C).–*B*.– Chromatoélectrophorèse sur papier des mêmes corps par chromatographie en une dimension (solvant: pyridine, 80; isopentanol, 40; acide acétique, 10; eau, 40), suivie d'une électrophorèse (mêmes conditions que *A*) dans l'autre dimension. *1* citrulline, *2* glycocyamine, *3* créatine, *4* acide γ-guanidobutyrique, *5* arginine, *6* arcaïne, *7* diméthylguanidine, *8* agmatine, *9* méthylguanidine, *10* guanidine (dépôt de la goutte du mélange dans l'angle supérieur gauche).

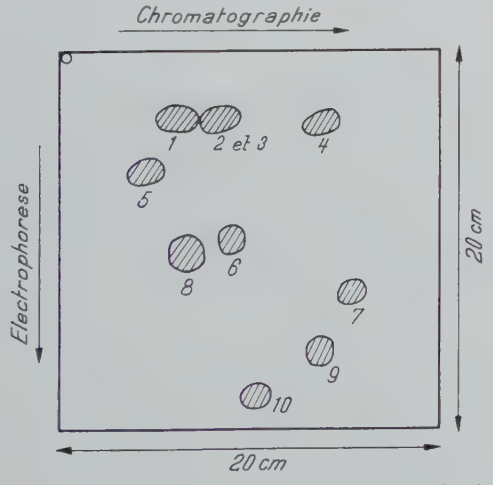


Fig. 2. Chromatoélectrophorèse sur papier de divers dérivés guanidiques et de la citrulline, réalisée par chromatographie monodimensionelle (solvant: *n*-butanol, 63; acide formique, 20; eau, 17) suivie d'électrophorèse (tampon au véronal de pH = 8,6 et de force ionique = 0,1, 300 V, 0,4 mA/cm, + 10°C). *1* citrulline, *2* glycocyamine, *3* créatine, *5* arginine, *7* diméthylguanidine, *8* agmatine, *9* méthylguanidine, *10* guanidine (lieu de dépôt de la goutte du mélange indiqué par un rond).

Dans les conditions correspondant au document *B* de la Figure 1, la séparation obtenue est satisfaisante, sauf pour la glycocyamine et la créatine. Les taches de celles-ci sont presque superposées, mais elles peuvent être différenciées au moyen des réactions colorées spécifiques de chacune d'elles (Tableau I). L'emploi d'un mélange de *n*-butanol, d'acide formique et d'eau (63:20:17), comme solvant dans la chromatographie préalable à l'électrophorèse, permet de localiser la glycocyamine et la créatine dans deux taches, la mono- et la diméthylguanidine étant alors, en revanche, confondues en une seule, comme le montre l'examen de la Figure 2.

L'association des deux méthodes d'analyse bénéficie d'avantages propres à chacune. Elle présente en outre, sur la chromatographie bidimensionnelle, celui d'être beaucoup plus rapide (8 h); sa sélectivité est par ailleurs différente, car elle met en œuvre la charge électrique des corps en même temps que leur comportement chromatographique. L'étude dont les résultats ont été présentés ici n'est qu'une application de la chromatoélectrophorèse à un groupe particulier de dérivés, dont l'identification dans des extraits de tissus animaux a été ainsi réalisée[1]. L'emploi de cette méthode est susceptible d'une large extension mettant en œuvre la migration électrophorétique à plusieurs pH et la chromatographie dans divers milieux. Deux d'entre nous poursuivent des recherches à ce sujet[2].

S. Lissitzky, Isabelle Garcia et J. Roche

Laboratoire de Biochimie générale et comparée, Collège de France, Paris, et Laboratoires de Chimie biologique et de Chimie générale et pharmaceutique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Alger, le 9 avril 1954.

Summary

Paper chromatography has been used in conjonction with electrophoresis in a perpendicular direction (chromatoelectrophoresis), in order to characterize various guanidoderivatives of biological interest and also citrulline. The isolation of definite spots can be obtained with a satisfactory selectivity by this procedure, at a higher speed than by bidimensional chromatography; and the use of a few coloured reactions (ninhydrine, Sakaguchi, diacetyle-α-naphtol and *p*-dimethylaminobenzaldehyde) on the same electrochromatogram has been successfully practised in this field.

[1] S. Lissitzky, I. Garcia et J. Roche, C. r. Soc. Biol. *148*, 436 (1954).

[2] Un intéressant travail de J. Blass, O. Lecomte et J. Polonovski sur la chromatoélectrophorèse des acides aminés a paru C. Bull. Soc. Chim. biol. *36*, 627 (1954) après le dépôt de la présente note (addendum de [2] à la correction des épreuves).

Sul significato dell'affinità dei granuli neutrofili dei leucociti per i coloranti tipo Sudan

Da un esteso esame critico e sperimentale della sudanofilia leucocitaria Lillie e Burtner[1] hanno recentemente tratto la conclusione che l'affinità dei leucociti neutrofili per i coloranti tipo Sudan non dipende dalla liposolubilità dei coloranti stessi, ma da una vera combinazione chimica fra il radicale β-naftolico della loro molecola e i granuli «sudanofili».

[1] R. D. Lillie e H. J. Burtner, J. Nat. Canc. Inst. *13*, 220 (1952); J. Histochem. Cytochem. *1*, 8 (1953).

Queste conclusioni si fondano, essenzialmente, sulla constatazione che tali granuli: *a*) possiedono sudanofilia modesta, la cui evidenziazione richiede coloranti molto energici (Sudan nero B, Oil Red O) o particolari accorgimenti tecnici (trattamenti prolungati, o a caldo, o con sostanze di tipo fenolico); *b*) sono scarsamente solubili nei solventi organici; *c*) resistono alla decolorazione con solventi organici in eccesso e, una volta decolorati, perdono del tutto o in parte l'affinità per il Sudan; *d*) a differenza di altre strutture citologiche di natura lipidica, presentano affinità assai ridotta o nulla per campioni di Sudan nei quali il radicale β-naftolico sia stato preventivamente bloccato mediante esterificazione.

Discutendo le surriferite vedute di Lillie e Burtner, Gomori[1] le ha implicitamente condivise, esprimendo l'opinione che la sudanofilia dei granuli neutrofili si identifichi con la loro affinità per i naftoli (*naftolofilia*[2]). È chiaro che ove si accettassero queste conclusioni risulterebbe demolito ogni argomento probante la natura lipidica delle granulazioni neutrofile e infirmato lo stesso significato istochimico, fin'ora indiscusso, della sudanofilia in generale. Val quanto dire che si profila la necessità di riesaminare una parte considerevole della letteratura istochimica di questi ultimi anni.

Tuttavia alcune notizie della letteratura e i risultati di ricerche citochimiche cui stavo dedicandomi al momento della pubblicazione dei lavori sopracitati, mi indussero ad accogliere con riserva le suddette conclusioni, e ad estendere le indagini onde chiarire alcuni aspetti oscuri del problema.

In collaborazione con Bottino[3] ho potuto stabilire: 1. che le granulazioni dei leucociti neutrofili oltre ad essere sudanofile, reagiscono positivamente anche alle reazioni per i lipidi fondate sulla fluorescenza indotta da 3–4-benzopirene (Berg[4]) e da Fosfina 3R (Pearse[5]); 2. che il trattamento preventivo con β-naftolo potenzia in tali granulazioni non solo la sudanofilia (de Brujin[6]) ma anche la positività al *solfato di Bleu Nilo secondo Cain* e la *solubilità nei solventi organici*; 3. che la decolorazione dei granuli colorati con Sudan nero B, mediante solventi organici in eccesso, è ottenibile in tempi molto inferiori a quelli indicati da Lillie e Burtner.

Se ora si considera che la fluorescenza indotta dal 3–4-benzopirene e dalla Fosfina 3R è ritenuta espressione della liposolubilità di queste sostanze[7] è evidente che per negare la liposolubilità del Sudan nelle granulazioni neutrofile si dovrebbe poter negare anche quella del benzopirene e della fosfina, e trovare anche per queste due sostanze la possibilità di un legame chimico. Ma ciò risulta inverosimile per il fatto che fra le molecole del benzopirene, della fosfina e dei Sudan non v'è nessuna analogia di struttura chimica, ed in particolare la molecola del benzopirene, notoriamente lipofila e idrofoba, non possiede nessun radicale passibile di legami chimici.

Quanto poi alla difficoltà di estrarre i Sudan dai granuli neutrofili, pur prescindendo dalle divergenze esistenti a questo riguardo fra i nostri reperti e quelli di Lillie e Burtner, si può osservare innanzitutto che secondo Berg[1] la velocità di colorazione di una data localizzazione lipidica è funzione, fra l'altro, della viscosità dei lipidi presenti: tanto minore, cioè, la prima quanto maggiore è la seconda. È evidente che lo stesso principio deve valere anche per il processo di decolorazione. Ma oltre a ciò va notato che si può anche ammettere, teoricamente, che nell'interno del granulo esista qualche altra sostanza, distinta dalla componente lipidica, alla quale il Sudan potrebbe legarsi chimicamente, dopo essersi disciolto in quest'ultima.

A questo proposito ho però potuto dimostrare, in collaborazione con M. Soldati: 1. che le granulazioni neutrofile possiedono una componente proteica contenente arginina[2]; 2. che il trattamento con β-naftolo facilita la dimostrazione istochimica dell'arginina[3]; 3. che la naftolofilia osservata da Gomori nelle granulazioni neutrofile è dimostrabile anche in altre strutture citologiche sudanofobe (nuclei, eritrociti, piastrine), che essa va intesa come affinità specifica per l'α-naftolo, con esclusione del β-naftolo e del fenolo e che essa dipende presumibilmente dalla presenza, nelle strutture naftolofile di arginina[2].

Non sono quindi verosimili le vedute di Gomori[4] secondo cui l'affinità dei granuli neutrofili per i Sudan dipenderebbe da un fenomeno di naftolofilia sostenuto dal radicale β-naftolico della loro molecola.

D'altro canto, la mancata colorabilità dei granuli neutrofili da parte dei Sudan esterificati non sembra possedere quel significato determinante accordatole da Lillie e Burtner a sostegno delle loro conclusioni. Se si accetta infatti il concetto (Michaelis[5], Lison[6]) che la sudanofilia di una determinata localizzazione lipidica è funzione del rapporto fra i coefficienti di solubilità del Sudan nella localizzazione e nel solvente, si deve anche ammettere a priori che l'esterificazione del colorante determini una modificazione di tale rapporto, le cui repercussioni possono essere trascurabili nei riguardi di alcune strutture lipidiche, ma rilevanti e significative nei riguardi di altre.

Ciò sembra tanto più verosimile ove si consideri la coesistenza nel granulo neutrofilo di una componente proteica (documentata dalla presenza di arginina (Perugini e Soldati[7]) e di gruppi tiolici (Mauri e coll.[8]), che può interferire negativamente sulla dimostrabilità della componente lipidica. In tal senso sono assai significative le citate osservazioni relative all'influsso esercitato dal β-naftolo sull'esito delle diverse reazioni citochimiche: tali osservazioni avvalorano infatti l'ipotesi di de Brujin[9] che i naftoli, come il fenolo, esplichino sui granuli azione lipofanerotica, anche se non è possibile per ora precisare se detta azione si attui mediante una vera rottura di legami lipoproteici o attraverso una modificazione della struttura chimico-fisica o submicroscopica dei granuli o del citoplasma.

A mio avviso questa complessità di costituzione chimica dei granuli neutrofili rappresenta un dato di

[1] G. Gomori, J. Nat. Canc. Inst. *13*, 221 (1952).
[2] G. Gomori, *Microscopic Histochemistry* (Univ. of. Chicago Press 1952).
[3] S. Perugini e D. Bottino (in stampa).
[4] N. O. Berg, Acta Path. Scand. Suppl. *90*, (1951).
[5] A. G. E. Pearse, *Histochemistry* (J. e A. Churchill, London 1953).
[6] P. P. H. de Brujin, Acta Neerl. Morph. *2*, 322 (1939).
[7] N. O. Berg, Acta Path. Scand. Suppl. *90*, (1951). – A. G. E. Pearse, *Histochemistry* (J. e A. Churchill, London 1953).
[8] C. Mauri, F. Vaccari e B. Sabotto, Medicina (in stampa).
[9] A. G. E. Pearse, *Histochemistry* (J. e A. Churchill, London 1953).

fatto che deve sempre essere tenuto presente nella valutazione dei singoli reperti citochimici che ad essi si riferiscono e che può facilitare la spiegazione di taluni loro comportamenti apparentemente anormali. I molti elementi già raccolti in proposito, saranno discussi in altra sede[1].

Per ora mi preme sottolineare il fatto che l'*esistenza nei granuli neutrofili di una componente lipidica risulta inequivocabilmente confermata*, e che le *divergenze esistenti fra il comportamento di tali granuli e quello delle più comuni localizzazioni lipidiche di altri tessuti, non infirmano il significato tradizionale fin'ora attribuito alla sudanofilia dei granuli neutrofili.*

S. Perugini[2]

Istituto di Patologia medica dell'Università di Modena e Istituto di Anatomia comparata dell'Università di Pavia, il 11 maggio 1954.

Summary

On the grounds of cytochemical findings and of critical arguments, the author reaffirms that the sudanophilia of neutrophile leucocytes depends on their lipidic content and not on some chemical combination of the dyes with cytoplasmic constituents, as yet unexplained, as suggested by Lillie and Burtner, and by Gomori.

[1] S. Perugini e D. Bottino (in stampa). – S. Perugini e M. Soldati, Biol. Latina (in stampa); Riv. Istoch. norm. pat. (in stampa).

[2] Borsista del Consiglio Nazionale delle Ricerche presso l'Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Pavia.

Feeding Habits and Physiology of Digestion of Certain Leafhoppers Homoptera: Jassidae

Investigations on the feeding habits of certain leafhoppers have revealed that they show a certain degree of specificity to a particular plant tissue for drawing their food-sap. On this basis they can be grouped into two categories. One of these includes forms which feed mainly upon the mesophyll tissue. The species recorded under this category are: *Empoasca bifurcata* DeL., *E. erigeron* DeL., *E. filamenta* DeL., *E. abrupta* DeL., and *E. maligna* (Walsh) (Smith and Poos[1]), and *Typhlocyba pomaria* McAtee (Putman[2]). The other category includes forms which suck the sap primarily from the vascular bundles, particularly from the phloem tissue. The species recorded under this group are: *Empoasca fabae* (Harris) (Smith and Poos[1]), *Homalodisca triquerta* (Fab.) (King and Cook[3]), *Graphocephala versuta* (Say) (King and Cook[3]), *Eutettix tenellus* Bak. (Bennet[4]), *Cicadulina mobila* (Naude) (Storey[5]), *Macropsis trimaculata* (Fitch) (Putman[2]), and *M. insignis* (Van Duzee) (Putman[2]).

The significance of this specificity to a particular plant tissue shown by jassids is not clear. In the case of *Eutettix tenellus*, which feeds upon the phloem tissue of sugar-beet petioles, Fife and Frampton[6] have shown that the stylets of this insect are guided to their objective by a pH gradient which exists between the epidermis and the phloem. Their experiments, however, do not throw light on the physiological value of this tissue-specificity. Experiments of Bennet[1] on the same leafhopper reveal that the individuals fed on the parenchyma of sugar-beet petiole show a much higher rate of mortality than do those fed on the phloem tissue. This indicates that the parenchyma does not serve as a favorable source of food for these insects.

Further elucidation of the physiological relationship between the leafhoppers and the plant tissue attacked requires a knowledge of their physiology of digestion. At present our knowledge of this aspect is confined to Herford's[2] record of the occurrence of two enzymes, diastase and invertase, in the salivary secretion of *Empoasca solana* DeL. The study of this aspect was, therefore, taken up in four species of jassids, namely, *Empoasca kerri* Pruthi, *E. devastans* Dist., *Tettigella spectra* (Sign.) and *Parabolocratus porrectus* Walk.

The methods employed for the study of stylets' track through the plant tissue were those adopted by Smith[3] and Putman[4]. For the determination of digestive enzymes the usual practice of preparing the extracts of digestive organs by grinding was avoided in order to exclude the endoenzymes. The latter are not liberated in the lumen of the gut and, hence, cannot take part in the digestion of food prior to its absorption. Only the contents of the lumen were drawn out and tested for the presence of various enzymes. The technique for their detection is described elsewhere.

Of the four species included in the present study, *Tettigella spectra* and *Parabolocratus porrectus* confine their feeding to plants of the family Graminae. They show a great preference for doobgrass (*Cynodon dactylon*), maize (*Zea mays*), and, sometimes also for paddy (*Oryza sativa*). On the other hand, *Empoasca kerri* and *E. devastans* do not feed on gramineous plants. *E. kerri* feeds mostly on plants of pigeon pea (*Cajanus indicus*), potato (*Solanum tuberosum*) and castor (*Ricinus communis*) while *E. davastans* feeds on malvaceous plants like cotton (*Gossypium* spp.), *Hibiscus* spp., and also on potato, and brinjal (*Solanum melongena*). The first two species suck the sap from the phloem tissue while the latter two feed mostly on the mesophyll tissue.

The distribution of enzymes in different parts of the digestive tract is shown in the accompanying table. It is apparent from this table that the enzymes present in the mesophyll-feeding *E. kerri* and *E. devastans* are: amylase, maltase, invertase, alkaline proteinase, polypeptidases, chlorophyllase and, in *E. kerri* only, lipase. These enzymes act upon starch, maltose, sucrose, proteins, polypeptides, chlorophyll and fat globules respectively to yield diffusable substances. On the other hand, in the phloem-feeding jassids, *T. spectra* and *P. porrectus*, the enzymes amylase, proteinase, lipase and chlorophyllase are absent. Hence, these insects cannot utilise nondiffusable substances like starch, native proteins and lipids, which are abundant in the mesophyll cells. The sap in the phloem is, however, rich in soluble substances which are either already in a diffusable state or can be rendered diffusable by the enzymes present in these insects. When they are artificially fed on solutions of starch, casein, gluten or oil emulsion they die much more quickly than do the individuals fed on solutions of maltose, cane sugar, glucose and tryptophane. In the former case the

[1] F. F. Smith and F. W. Poos, J. Agri. Res. *43*, 267 (1931).

[2] W. L. Putman, Canad. Ent. *73*, 39 (1941).

[3] W. V. King and W. S. Cook, U. S. Dep. Agri. Tech. Bull. No. 296 (1932).

[4] C. W. Bennet, J. Agri. Res. *48*, 665 (1932).

[5] H. H. Storey, Proc. Roy. Soc. (London) [B] *125*, 455 (1938).

[6] J. M. Fife and V. L. Frampton, J. Agri. Res. *53*, 581 (1936).

[1] C. W. Bennet, J. Agri. Res. *48*, 665 (1932).

[2] G. V. B. Herford, Ann. Appl. Biol. *22*, 301, 306 (1935).

[3] K. M. Smith, Ann. Appl. Biol. *13*, 109 (1926).

[4] W. L. Putman, Canad. Ent. *73*, 39 (1941).

nutrients have been observed to get clogged in the midgut and thus cause a distention of the 1st ventriculus. Sometimes the latter may even rupture.

Table showing the distribution of digestive enzymes of the leafhoppers

Name of insect	Organ	Amylase	Maltase	Invertase	Alkaline Proteinase	Polypeptidase	Lipase	Chlorophyllase
E. kerri . . .	Salivary glands	×	–	×	–	–	–	–
	midgut	×	×	×	×	×	×	×
E. devastans .	Salivary glands	×	–	×	–	–	–	–
	Midgut	×	×	×	×	×	–	×
T. spectra . .	Salivary glands	–	–	×	–	–	–	–
	Midgut	–	×	×	–	×	–	–
P. porrectus .	Salivary glands	–	–	×	–	–	–	–
	Midgut	–	×	×	–	×	–	–

Note: (i) '×' denotes the presence and '–' the absence of enzymes.
(ii) The hind gut did not show the presence of these enzymes.

These observations suggest that the specificity of jassids to a particular plant-tissue is related to the distribution of enzymes in their digestive tract and, hence, to their capacity to utilize various nutrients.

Thanks are due to Dr. M. L. Bhatia for encouragement in my work.

K. N. Saxena

Department of Zoology, University of Delhy, February 15, 1954.

Zusammenfassung

Die Zikaden *Empoasca kerri* und *E. devastans* saugen in erster Linie den Saft des Mesophyllgewebes, während *Tettigella spectra* und *Parabolocratus porrectus* sich hauptsächlich vom Phloemgewebe ernähren. Bei den mesophyllfressenden Formen sind folgende Fermente vorhanden: Amylase, Maltase, Invertase, alkalische Proteinase, Polypeptidasen, Chlorophyllase und allein bei *E. kerri* Lipase. Die Phloemfresser besitzen nur Maltase, Invertase und Polypeptidase.

On the Ovary Development in Queenless Worker Bees (*Apis mellifica* L.)

Introduction. If the queen of a colony of honeybees gets lost, a new one is reared from a fertilized egg or a young female larva. If, however, in a queenless colony, no eggs or young larvae are available, a development occurs in the ovaries of a great number of worker bees resulting in the production of haploid eggs from which only drones emerge. As long as a queen is present in a colony, the ovaries of the worker bees remain small and undeveloped with no differentiation in the ovarioles. Thus the presence of the queen prevents the development of the worker bee ovary. The nature of the factors responsible for the inhibition of the worker bee ovary in a queen-right colony is still unknown, and so far experimental data concerning this problem are scanty and contradictory[1].

In an attempt to obtain more information on this problem, experiments were performed with small groups of bees kept under laboratory conditions.

Material and methods. Very young worker bees, emerging from a comb with sealed brood in an incubator, were used as experimental material. Within 24 h after emergence, groups of about 50 bees were transferred into Liebefelder experimental cages. The caged bees were kept at 30°C throughout the experiment and supplied with food and water *ad libitum*. The food consisted of sugar candy containing bee gathered pollen in a concentration of 15% of the dry sugar. (For further details of this method of keeping bees see[2].) After about 3 weeks, the bees were killed with chloroform and dissected under 70% alcohol. The development of the ovaries was studied under a binocular microscope using the classification of developmental stages as given by Hess[3]. According to this method, the degree of development is qualified by the figures 1–5, representing a development of respectively none, first signs, distinct, high and highest. Based on the situation in a normal bee colony, the stages 1 and 2 were considered as undeveloped and only the stages 3, 4, and 5 as developed.

Results. In preliminary experiments, it was observed that the degree of development of the ovaries of young worker bees caged without a queen is highly dependent on the amount of pollen consumed. In order to eliminate as far as possible the variable factor of pollen intake, which might influence the results, the bees were forced to consume the pollen by incorporation in sugar candy. A pollen concentration of 15% was sufficient to obtain a development of more than 50% of the ovaries within a period of 21 days. At higher pollen concentrations many bees died, apparently as a result of accumulation of indigestible material in the gut. In subsequent experiments a pollen concentration of 15% was therefore used.

Under the conditions of our experiments, the presence of a queen resulted in a complete inhibition of ovary development of the worker bees during the first three weeks, whereas, in the controls without a queen, the number of developed ovaries after three weeks varied between 50 and 100%. A virgin queen prevented the ovary development as well as a mated one. More surprising was the observation that the inhibiting influence is not only exerted by a living queen but also by the presence of a dead one. In general the effect of dead queens decreased with increasing time after the queen had been killed, but in some experiments even after 12 months a distinct inhibition was obtained.

In further experiments it turned out that especially certain parts of a dead queen attract the worker bees and exert a distinct influence. If only the head of a queen was present an almost complete suppression of ovary development was obtained. The influence of an

[1] G. Hess, *Über den Einfluss der Weisellosigkeit und des Fruchtbarkeitsvitamins E auf die Ovarien der Bienenarbeiterin*, Beih. Schweiz. Bienenz. *1*, 33 (1942). – A. Müssbichler, *Die Bedeutung äusserer Einflüsse und der Corpora allata bei der Afterweiselentstehung von Apis mellifica*, Z. vgl. Physiol. *34*, 207 (1952). – J. Pain, *L'alimentation et le développement des ovaires chez l'ouvrière d'abeille*, Arch. int. Physiol. *59*, 203 (1951); *La «substance de fécondité» dans le développement des ovaires des ouvrières d'abeilles (Apis mellifica L.). Critique des travaux de* Müssbichler, Insectes Sociaux *1*, 59 (1954).

[2] A. P. de Groot, *Protein and Amino Acid Requirements of the Honeybee (Apis mellifica L.)*, Physiol. Comp. Oecol. *3*, 197 (1953).

[3] G. Hess, *Über den Einfluss der Weisellosigkeit und des Fruchtbarkeitsvitamins E auf die Ovarien der Bienenarbeiterin*, Beih. Schweiz. Bienenz. *1*, 33 (1942).

Table

	Number of ovaries in stage 1–5					Percent developed
	1	2	3	4	5	
Queenless 1	5	10	13	10	7	67
Queenless 2	4	3	22	6	4	82
Dead fecundated queen (freshly killed)	44			2		4
Dead virgin queen (10 days)	36					0
Dead fecundated queen (10 months)	44			2		4
Dead virgin queen (12 months)	23	6	4	3	1	22
Dead fecundated queen head	43	1				0
thorax	8	7	15	10	1	63
abdomen	41	1	2	4		13

Inhibition of ovary development by dead queens or separated queen head, thorax and abdomen.

isolated queen abdomen was somewhat less, whereas the thorax exerted no distinct influence. The results of only one of the experiments showing a clear effect of dead queens or parts of it are given in the table.

In order to investigate the significance of direct (mechanical) and indirect contact between queen and worker bees for the inhibition of ovary development, three experimental cages with 50 bees in each were fastened against each other. The middle cage containing a queen was separated from the one by a single layer of gauze which prevented the passage of the bees, and from the other by two such layers of gauze at a distance of about 20 mm. Any direct contact of the queenless bees in the latter cage with the queen was impossible. In these experiments, development of the ovaries only occurred in the bees separated from the queen by the double gauze wall. Thus the bees, which were not allowed a direct contact with the queen or the queen attendants by means of tongue or antennae, developed the ovaries while the others did not.

In another experiment, two cages with 50 bees in each and one containing a queen were separated partly by a zinc plate, partly by gauze. The cage with the queen was divided into two compartments by means of a queen excluder. The queen was placed in the compartment separated from the queenless bees by the zinc plate. In this way the queenless bees were unable to touch the queen. Indirect contact was possible by means of the bees which could pass the queen excluder. In this experiment the ovaries of the queenless bees were not inhibited, which points to the necessity of a direct contact between each worker bee and the queen for the inhibition of the ovaries.

Comparable results were obtained in experiments with dead queens. If a dead queen was surrounded by gauze in such a way that the worker bees were unable to to touch it, the ovaries developed to the same extent as without a queen, whereas in the controls with a dead queen not surrounded by gauze ovary development was suppressed.

From these experiments, we are inclined to conclude that it is neither the odour of the queen, nor the active transfer of certain substances from the worker bees to the queen or conversely, which accounts for the results obtained. A logical explanation seems to be the presence of a substance on the surface of the queen which after consumption by the worker bees inhibits the development of the ovaries.

To test this hypothesis, dead queens were extracted with ethanol in a Soxhlet apparatus. In the presence of an extracted queen, about the same development of the ovaries was obtained as shown by control bees without a queen, while a queen which was extracted but afterwards impregnated with the extraction fluid inhibited the ovaries almost completely. About the same results were obtained if the queens were extracted with acetone instead of ethanol.

These observations support the above-mentioned hypothesis. Further experiments are needed, however, to allow a more definite conclusion.

A. P. de Groot and Stien Voogd

Laboratory of Comparative Physiology, University of Utrecht, March 8, 1954.

Zusammenfassung

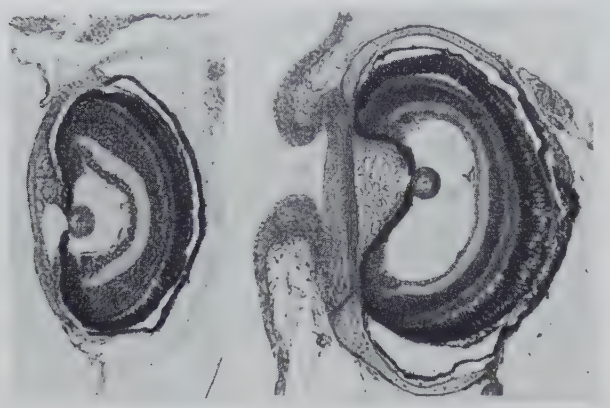
Gruppen von 50 Jungbienen wurden in kleinen Versuchskäfigen im Thermostaten bei 30°C gehalten und mit Zuckerteig + 15% Pollen gefüttert. Bei Anwesenheit einer Königin entwickelten sich ihre Ovarien nicht. Ohne Königin waren jedoch die Ovarien bei Tötung nach 3 Wochen deutlich entwickelt. Die hemmende Wirkung geht nicht nur von der lebenden Königin aus: auch bei Anwesenheit einer toten Königin unterbleibt die Ovarienentwicklung. Es genügte sogar bloss deren Kopf oder Abdomen; der Thorax hingegen war nicht deutlich wirksam. Für das Zustandekommen der hemmenden Wirkung ist direkter Kontakt jeder einzelnen Arbeiterin mit der Königin bzw. deren erwähnten Körperteilen erforderlich. Mit Alkohol oder Azeton extrahierte Königinnen waren unwirksam; nach Imprägnierung mit der Extraktflüssigkeit wirkten sie wieder hemmend.

Aus den Versuchen scheint somit hervorzugehen, dass die Entwicklung der Arbeiterinnen-Ovarien normalerweise deshalb unterbleibt, weil jede einzelne Arbeiterin in direktem Kontakt vom Körper der Königin eine Substanz aufnimmt, welche die Ovarienentwicklung hemmt.

Augenrückbildung und Lichtsinn bei *Anoptichthys jordani* Hubbs und Innes

Blinde Höhlenfische sind aus verschiedenen Familien und aus ganz verschiedenen Regionen bekannt: so *Stygi-*

cola dentatus Poey (Brotulidae) aus Kuba[1], *Caecobarbus Geertsii* (Cyprinidae) aus dem Belgisch-Kongo-Gebiet[2] und *Anoptichthys jordani* Hubbs und Innes (Characidae) aus Zentralmexiko[3]. Die meisten der vorliegenden Arbeiten befassen sich mit Fragen der Evolution und der

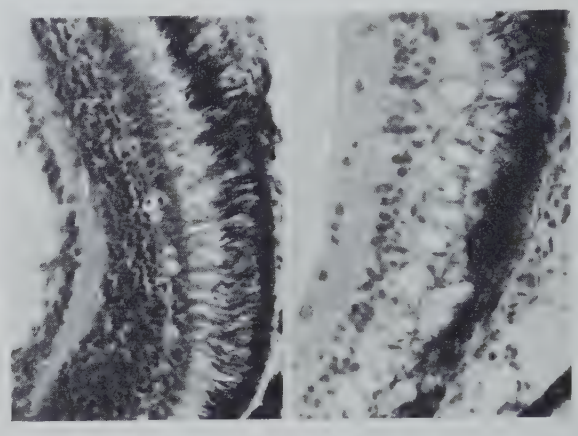


a *b*

Abb. 1*a*. Auge eines 8 mm langen *Anoptichthys jordani*, Frontalschnitt, Vergrösserung 100×.
Abb. 1*b*. Auge eines 15 mm langen *Anoptichthys jordani*, Frontalschnitt, Vergrösserung 100×.

Ökologie. Nachdem es möglich wurde, Anoptichthys in Europa zu erhalten und zu züchten, lag es nahe, die Sinnesphysiologie, insbesondere die Frage eines Lichtsinnes und seine Beziehung zu den verschiedenen Rückbildungsstadien der Augen, bei diesen Höhlenbewohnern im Vergleich zu den in freien Gewässern lebenden Fischen zu untersuchen. Über das Vorhandensein eines Lichtsinnes bei Anoptichthys sind verschiedene Ansichten geäussert worden[4]. Mit Hilfe der Dressurmethode[5] ist es uns gelungen, die Rezeption von Helligkeitsunterschieden und deren untere Grenze eindeutig nachzuweisen. Die Frage des Rezeptionsortes, das heisst der Nachweis einer – wenn auch beschränkten – Funktionstüchtigkeit der Augen bis zu einem bestimmten Rückbildungsstadium, das Vorhandensein eines Hautlichtsinnes oder eines Rezeptionsvermögens im Bereich des Zwischenhirns[6] geht ihrer Klärung entgegen.

Junge *Anoptichthys jordani* schwimmen 5–6 Tage nach dem Schlüpfen frei. Die Augen sind bei ihnen kleiner als bei Jungfischen verwandter Arten. Zehn Tage alte Tiere haben bei einer Körperlänge von 7 bis 8,2 mm (von Kopfspitze bis Schwanzflossenansatz gemessen) noch oberflächlich gelegene Augen mit ausserordentlich kleinen Linsen und Pupillen (Abb. 1*a*). Während Sklera und Chorioidea mit Argentea einen für Teleosteer typischen Bau aufweisen, erscheint die Kornea verdickt. Die vordere Augenkammer wird eingeengt durch ein vom Sklerokornealrand in sie hineinwucherndes Gewebe, das wohl dem Ligamentum annulare entspricht. Die Linse besteht nur aus Epithelzellen, jede Faserbildung fehlt. Die Retina erscheint normal gebaut, der Nervus opticus tritt in die untere Retinahälfte ein, ventral von ihm ist die Augenblase in zwei Kammern aufgeteilt. Diese Spaltung betrifft Retina und Pigmentepithel. Es wird angenommen, dass diese Bildung der fötalen Augenspalte entspricht. Die Augenmuskeln sind wohlausgebildet.



a *b*

Abb. 2*a*. Retinaausschnitt vom Auge eines 15 mm langen *Anoptichthys jordani*, Vergrösserung 444×.
Abb. 2*b*. Retinaausschnitt vom Auge eines 27 mm langen *Anoptichthys jordani*, Vergrösserung 444×.

Bei 28 Tage alten, auf 13–17,4 mm herangewachsenen Tieren sind auch die Augen, mit Ausnahme der Linsen, grösser geworden, die Pupillen erscheinen bei fast allen Augen verengt (Abb. 1*b*). Das in die vordere Augenkammer hineinwuchernde Gewebe füllt diese jetzt ganz aus. Rings um das Auge beginnt die Haut wulstartig auf die Korneamitte vorzuwachsen. Die Retina ist immer noch gut entwickelt (Abb. 2*a*). Ein Vergleich des Auges eines 13 mm langen *Hemigrammus unilineatus* (Characidae) mit dem eines gleich grossen *Anoptichthys jordani* zeigt folgende Verhältnisse:

	Frontaler Augendurchmesser	Linsendurchmesser	Pupillenweite
Hemigrammus . .	0,95 mm	290 μ	300 μ
Anoptichthys . .	0,51 mm	33 μ	20 μ

Bei 80 Tage alten, 24–33 mm langen Anoptichthys sind die Augen in die Tiefe der Orbita verlagert (Abb. 3). Die Hautwülste haben die Augen soweit überwachsen, dass nur über der Korneamitte ein englumiger Kanal frei bleibt. Rings um das Auge wachsen neue Epidermisfalten auf die Einsenkungsstelle zu und sorgen für einen weiteren Abschluss des Auges von der Körperoberfläche. Die Augen sind in allen Fällen grösser geworden, bei einigen sind auch die Linsen etwas vergrössert, während bei anderen Linsen und Pupillenöffnungen jetzt ganz fehlen.

In diesem Stadium zeigt auch die Retina Degenerationserscheinungen (Abb. 2*b*). So kann die Schicht der Stäbchen und Zapfen mit entsprechend wenigen Kernen auch in der äusseren Körnerschicht verödet sein, oder es erscheint die innere Körnerschicht verarmt und aufgelockert. Auch das Pigmentepithel kann klumpig degenerieren.

Das Auge des adulten Anoptichthys liegt tief in der Orbita, umgeben von einer geschlossenen Pigmenthülle (Abb. 4). Die Retina ist weitgehend verödet. Es erscheint

[1] C. Kosswig, Verh. Zool. Ges. Greifswald, Suppl. 7, 185 (1934).
[2] M. J. Heuts, Ann. Soc. Roy. Zool. Belg. *82*, II, 155 (1951).
[3] C. M. Breder, Jr., Zoologica *27*, 7 (1942).
[4] E. Meder, Dtsch. Aqua. Terr. Z. *5*, 171 (1952). – K. H. Lüling, Dtsch. Aqua. Terr. Z. *6*, 62 (1953). – C. M. Breder, Jr., und P. Rasquin, Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. *89*, 323 (1947). – K. H. Lüling, Zool. Anz. *151*, 289 (1953).
[5] K. v. Frisch, Verh. dtsch. Zool. Ges. *29*, 21 (1924).
[6] E. Scharrer, Z. vgl. Physiol. *7*, 1 (1928).

Die Augenmaße bei verschiedenen Altersstufen von *Anoptichthys jordani*

Alter	10 Tage			28 Tage			92 Tage		
Grösse (mm)	7	7	8	13	15	16	28,5	31	31
Rechtes Auge, Durchmesser (mm)	0,31	0,35	0,41	0,51	0,56	0,64	0,77	0,71	0,95
Linse, Durchmesser (μ) . .	38	40	49	33	33	66	33	126	34
Pupillenweite (μ).	38	38	43	20	20	17	—	50	—
Linkes Auge, Durchmesser (mm)	0,34	0,37	0,41	0,52	0,53	0,60	0,73	0,76	0,95
Linse, Durchmesser (μ) . .	34	40	42	33	31	50	—	132	—
Pupillenweite (μ).	33	37	40	12	14	8	—	66	—

Die Tabelle gibt Einzelbeispiele aus einer grösseren Anzahl von untersuchten Tieren. — bedeutet Fehlen der betreffenden Struktur.

kaum vorstellbar, dass dieses Gebilde noch als Lichtsinnesorgan funktionieren kann.

Da ganz junge Anoptichthys gerichtet nach lebenden Cyclops und dergleichen schnappen und die Augen auch bewegen können, musste mindestens mit der Möglichkeit eines Bewegungssehens gerechnet werden. Um chemische und mechanische Sinnesorgane auszuschalten, wurden die Futtertiere (Cyclops) in einer aus dünnen Deckgläsern hergestellten Kammer geboten. Bei einer Lichtintensität von 136 Lux auf dem Boden des Versuchsbeckens wurde zunächst das Verhalten von zehn jungen *Colisa lalia* (Labyrinthici) und anschliessend das von zehn jungen *Hemigrammus unilineatus* (Characidae) geprüft. Sämtliche Jungfische versammelten sich kurz nach Futtereinbringung an der Kammerwand und schnappten, immer wieder gegen die Scheiben stossend, heftig nach dem Futter. Danach wurden zehn 7–12 mm lange Anoptichthys geprüft. Obwohl die Tiere 24 h lang gehungert hatten, schwammen sie regellos im Becken umher. Auch während einstündiger Beobachtung erfolgte kein Schnappversuch an der Kammerwand. Zwei weitere Versuche mit gleich grossen Anoptichthys verliefen ebenfalls negativ. Demnach scheint schon den ganz jungen Höhlensalmlern ein Sehen von Bewegungen zu fehlen. Angesichts der geringen Ausbildung von Linse und Pupille konnte damit gerechnet werden. Die Auffindung lebender, sich bewegender Beute muss wohl durch andere Sinnesorgane ermöglicht werden[1].

[1] S. Dijkgraaf, Exper. *8*, 205 (1952).

Abb. 3. Auge eines 27 mm langen *Anoptichthys jordani*, Frontalschnitt, Vergrösserung 100×.

Abb. 4. Auge eines 65 mm langen *Anoptichthys jordani*, Transversalschnitt, Vergrösserung 100×.

Anschliessend wurde mit Hilfe der Dressurmethode geprüft, ob *Anoptichthys jordani* überhaupt Helligkeitsunterschiede zu empfinden vermag. 20 mm lange Tiere (Augen etwa wie in Abb. 1*b*) wurden einzeln in Dunkelaquarien untergebracht. Bei der Fütterung wurden die Becken mit einer Lichtintensität von 136 Lux (auf dem Beckenboden gemessen) bestrahlt. Geräusche und Erschütterungen traten dabei nicht auf. Nach einer Andressur von 45 Tagen zeigten die Fische ihre charakteristischen Suchbewegungen auch bei Belichtung ohne Futtergabe. Die Reaktionen traten 2–8 Sekunden nach Reizsetzung ein. Die jungen *Anoptichthys jordani* können also Helligkeitsunterschiede wahrnehmen.

Bei den folgenden Versuchen wurde zur Feststellung der unteren Reizschwelle die Lichtintensität herabgesetzt. Bei 68, 34, 17, 8, 2, 1 und 0,5 Lux traten mit geringen Abweichungen gleiche Reaktionszeiten wie bei 136 Lux auf. Bei 0,25 Lux reagierten die im Laufe der Versuche auf 30 mm herangewachsenen Tiere, deren Augen jetzt dem in Abbildung 3 gezeigten Stadium entsprechen müssten, bei 25 Testen fünfmal nicht mehr; die Latenzzeit der noch positiven Reaktionen erhöhte sich auf 11–17 s. Bei 0,12 Lux waren 15 von 25 Testen negativ, und die noch positiven Reaktionen traten erst nach 25–28 s ein. Bei noch geringerer Lichtintensität konnte der Beobachter nicht mehr sicher urteilen. Man darf jedoch aus diesen Ergebnissen den Schluss ziehen, dass um 0,12 Lux herum die untere Reizschwelle liegt.

Es fragte sich nun, ob auch adulte Fische mit weitgehend rückgebildeten Augen Helligkeitsunterschiede wahrnehmen können. In einem Vorversuch wurden zwei Tiere mit 50 bzw. 60 mm Körperlänge bei 136 Lux andressiert und auch getestet. Sie reagierten nach durchschnittlich 6,6 bzw. 6,3 s. Dieser Befund könnte darauf hindeuten, dass bei *Anoptichthys jordani* entweder neben den mehr oder weniger rückgebildeten Augen oder sogar vorwiegend ein anderes Organ bei der Aufnahme von Lichtreizen eine Rolle spielt. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung sind im Gange.

O. Kuhn und J. Kähling

Zoologisches Institut der Universität Köln, den 25. März 1954.

Summary

After hatching, young individuals of the Mexican blind characin *Anoptichthys jordani* Hubbs and Innes possess small, movable eyes. In the course of growth, the eyes are overlapped by skinfolds and tend to sink into the depth of the orbital cavity. Lens and pupilar opening may disappear and degeneration is to be found in the retina.

Even very young blind characins seem to have no vision of movements, while they are able to perceive light. The lower limit is about 0·12 Lux of light intensity. Experiments concerning the localisation of this perception of light are in progress.

PRO LABORATORIO

Über eine neue Methode der Messung sehr kleiner Mengen von CO in Luft, Blut und Lunge

Die bisher üblichen Methoden haben den Nachteil, dass sie zeitraubend sind und daher für fortlaufende Registrierung nicht taugen und ausserdem nicht gestatten, weniger als 1 Teil CO auf 500000 Teile Luft (oder Fremdgas) mit grösserer Genauigkeit zu bestimmen. Wir haben versucht, einen auf CO empfindlichen chemischen Reaktionsweg mittels spektro-photometrischer und elektronischer Messung ausfindig zu machen, und es gelang uns, ein Instrument zu bauen, welches gestattet, 1 Teil CO auf mehr als 100 Millionen Teile Luft zu messen und fortlaufend zu registrieren.

Es ist bekannt, dass HgO bei Erhitzung mit CO reagiert und Hg in dampfförmigem Zustand frei wird[1,2]. Die Menge des befreiten Hg ist proportional dem anwesenden CO und kann dann spectro-photometrisch bestimmt werden, indem man die Eigenschaft des Quecksilberdampfes benutzt, absorbierend auf die Hg-Resonanzlinie einer Hg-Lichtquelle zu wirken. Wir haben diese Idee ausgebaut und – je nach dem Verwendungszweck – eine Reihe von Instrumenten entwickelt, die handlich und transportabel sind.

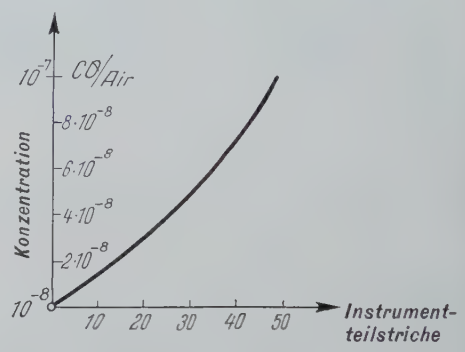


Abb. 1. Eichkurve im hoch sensiblen Bereich von 1 Teil CO auf 100 Millionen Teile Luft.

Ein derartiges Instrument besteht aus zwei Teilen: der chemischen Reaktionskammer und dem Quecksilberdampf-Messgerät. Die chemische Reaktionskammer besteht aus einem Ofen, der auf konstante Temperatur unterhalb 200°C gehalten ist und in dem sich zwei spiralenförmig gewundene Rohre befinden. Beide enthalten eine kleine Reaktionskammer, in der sich HgO befindet. Die beiden Rohrsysteme sind an eine kleine Pumpe angeschlossen, die gleichzeitig ein Bezugsgas (Frischluft bzw. mit CO bekannter Konzentration versetztes Gas) und CO-Gas unbekannter Konzentration in ein Quecksilberdampf-Messgerät hinübersaugt. In letzterem wird der frei gewordene Hg-Dampf gemessen. Das Gerät enthält eine zwecks höherer Empfindlichkeit besonders entwickelte Hg-Quarzlampe[3,4], deren Lichtfluss im 2537-Å-Bereich, nach Filterung des sichtbaren Anteiles, durch zwei Gaszellen läuft und auf zwei UV.-empfindliche Photozellen fällt. Über einen Brückenverstärker wird der resultierende Photozellenstrom einem Zeigerinstrument zugeführt oder zwecks Registrierung einem Schreibgalvanometer. Der Empfindlichkeitsbereich kann durch einen Stufenschalter eingestellt werden. Im empfindlichsten Bereich, den wir derzeit praktisch kontrollieren können, entspricht 1 Skalenteil am Instrument einer Konzentration von 1 Teil CO auf 100 Millionen Teile Luft oder Fremdgas. Es zeigte sich, dass bei erhöhter Stabilisierung von Temperatur und Reaktion die Empfindlichkeit noch weiter gesteigert werden kann. Die Genauigkeit im derzeitig höchsten

[1] J. D. McCullough et al., Anal. Chem. *19*, 999 (1947).
[2] A. O. Beckman *et al.*, Anal. Chem. *20*, 674 (1948).
[3] V. Tomberg, Strahlentherapie *59*, 371 (1937).
[4] V. Tomberg, Ber. Internat. Kongress für Lichtbiologie, Paris *21*, 153 (1950).

Empfindlichkeitsbereich ist 2% des gewählten Messbereiches[1].

Um den CO-Gehalt im Blut zu bestimmen, werden 5 Proben von je 2 cm³ in graduierten Gasflaschen mit 5 Tropfen einer 10%-H_2SO_4-Lösung versetzt. Die Flaschen mit dem ausgetriebenen CO werden dann nacheinander an die Messapparatur angeschlossen und die CO-Werte ermittelt.

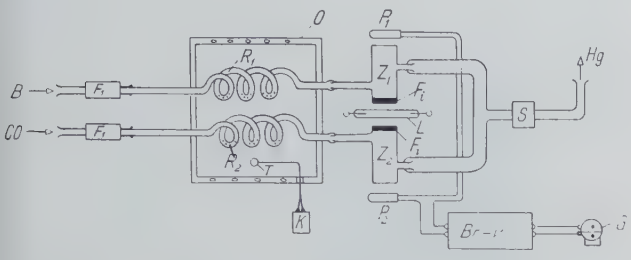


Abb. 2. Apparatur. CO-Gas und das Bezugsgas *B* werden durch die Pumpe *S* in das Apparatursystem hineingesaugt (Geschwindigkeit etwa 400 cm³ je min). Zuerst gelangen die Gase über 2 Filter F_1 und F_2 (aktive Holzkohle, gemischt zu gleichen Teilen mit Silica-Gel und CaO) in die Rohrkreise (Inox-Stahlrohre) R_1 und R_2, die mit roten HgO-Körnern gefüllt sind. Diese Rohrkreise befinden sich in einem elektrisch geheizten Ofen *O*, dessen Temperatur automatisch über temperatur-sensible Elemente (Thermistoren) und die elektronische Kontrollapparatur *K* auf etwa 200°C gehalten wird (auf 0,02°C genau). An die Rohrkreise sind die beiden zylindrischen Quarzzellen Z_1 und Z_2 geschaltet, in denen sich der frei werdende Hg-Dampf ansammelt. *L* ist die Quecksilberdampflampe, deren Licht nach Durchgang durch die beiden optischen Filter F_2 auf die Photozellen P_1 und P_2 fällt. Filter und Photozellen sind die im 2537-Å-Bereich üblichen Bestandteile der Spektrometer. Aus den Quarzzellen gelangen dann die Hg-Dämpfe über eine gemeinsame Rohrleitung ins Freie bzw. in eine Quecksilberfalle. P_1 und P_2 sind an den Brückenverstärker *Br.-V.* angeschlossen, der den Differenzstrom verstärkt einem Galvanometer (10^{-8} A per Skalenteil) zuführt. Die Eichung erfolgt mit Gasgemischen bekannter Konzentration.

Zur Bestimmung des CO-Gehaltes in der Ausatmungsluft werden 5-l-Gummiballone benutzt und mehrere Proben der Versuchsperson entnommen in der Art, wie es bei Stoffwechseluntersuchungen üblich ist. Dabei legen wir Wert darauf, Proben zu analysieren, die nach «leichter» Ausatmung und dann nach «heftiger» Ausatmung gewonnen werden. Im letzteren Falle ist, nach CO-Vergiftungen, eine für die Bewertung aufschlussreichere CO-Konzentration nachweisbar.

Die Messung so kleiner CO-Mengen gewinnt besondere Bedeutung bei der Erforschung des akkumulierenden Einflusses von CO-Dosen unterhalb der toxischen Einzeldosis, insbesondere bei längerer Anwesenheit in schlecht oder gar nicht gelüfteten Kabinen, zu denen die Luft von Verbrennungsmotoren Zugang hat, und zur Erforschung des kankerogenen Einflusses von kleinsten CO-Mengen bei Tabakrauchen mit und ohne Inhalation.

Der Taller & Cooper Mfg- Company in New York bin ich für Anregung und Unterstützung zu Dank verpflichtet.

V. Tomberg

Institute for Biophysical Research, 333 Central Park West, New York 25, N.Y., 17. Mai 1954.

[1] Da HgO auch mit Kohlenwasserstoffen reagiert, kann dieselbe Methode auch benutzt werden, um solche Gase in kleinsten Mengen zu messen, zum Beispiel Wasserstoff, Benzol, Ethylen usw. Selektive chemische Filter werden in den Eingangskreis eingebaut, um den Reaktionsprozess spezifisch zu gestalten.

Summary

We have developped a new method to detect and measure very small amounts of CO having a sensitivity of 1 p. CO per 100 million p. air. HgO is heated in an oven reaction chambre where it reacts with CO in releasing proportional amounts of mercury vapor; the latter is then measured quantitatively in an UV electronic spectrophotometer. Reaction chamber and UV meter are assembled into a handy portable unit. The CO amount in blood is measured by decomposing a sample of blood in a volumetric flask with H_2SO_4 and drawing the gas mixture through the unit. The CO amount in alveolar air is measured by means of breathing bags. It is thus possible to study the influence of subtoxic doses of CO and the cancerogenic action of tobacco smoking.

PRO LABORATORIO

Zentrifugenfiltration mit hohen Drucken

Die Klarfiltration von Gewebsextrakten und Gewebshomogenaten, zum Beispiel zum Zweck elektrophoretischer oder anderer Untersuchungen, bei denen mit optischen Systemen gearbeitet werden soll, erfordert die Benutzung sehr dichter Filtermembranen, die der Filtration schon einen beträchtlichen Widerstand entgegensetzen. Die Niederdruckfiltration im Vakuumfilterapparat mit maximal einer Atmosphäre Druck reicht dazu gewöhnlich nicht aus; ausserdem führt sie durch Austreten der Gase aus dem Filtrat gleich nach Passieren der Membran meist zu lästigem Schäumen; kleine Mengen sind wegen der dadurch entstehenden grossen Verluste nur schlecht zu verarbeiten. Das Arbeiten mit Überdruck über der zu filtrierenden Lösung andererseits erfordert sehr stabile Apparaturen und ist technisch aufwändig, erlaubt aber die Filtration mit grösseren Druckdifferenzen, also «Hochdruckfiltration» im Sinne von Bechold[1] mit Überdruck bis zu 150 Atmosphären (Bruckner und Overbeck[2]; A. Lohmann[3]).

Die Fliehkraft beim Zentrifugieren ist zur Erzeugung höherer Drucke zum Zweck der Filtration bisher kaum ausgenutzt worden, wenn auch schon alte prinzipielle Angaben vorliegen. So findet man bereits in Houbens Methodensammlung von 1925 eine «Filtrierzentrifuge» von Richards[4] beschrieben, in der ein Glastrichter über einem kleinen Becherglas hängend zentrifugiert wird. Die in dieser Anordnung erzeugten Drucke sind freilich gering. Bei Rosenthal findet man erwähnt, dass Sabouraud und Vernes[5] Filter verwendeten, die sie mit Gummikappen auf Zentrifugenröhrchen befestigten. 1926 wurde von Bach und Schepmann[6] ein kleiner gläserner Filterapparat mit zwischen zwei Glasstutzen freischwebend eingespannter Membran beschrieben. Wenig später benutzte Toth[7] eine in einem Zentrifugenröhr-

[1] H. Bechold, in Abderhaldens Handb. biol. Arbeitsmeth., Abt. III [B], Lieferg. *66*, 333 (1922).

[2] B. Bruckner und W. Overbeck, Koll. Z. *36*, Zsigmondy-Festschr. 192, 192 (1925).

[3] A. Lohmann, Z. Biol. *57*, 183 (1912).

[4] T. W. Richards, zitiert nach Houben, Meth. organ. Chem. *1* 413 (1925).

[5] Sabouraud und Vernes, zitiert nach Rosenthal, Handb. mikrobiol. Techn.

[6] F. W. Bach und W. Schepmann, Klin. Wschr. *5*, 893 (1926).

[7] Toth, Biochem. Z. *191*, 355 (1927).

chen hängende mit einer Kollodium- oder Viskosemembran ausgegossene Porzellanfilterkerze.

Die bisherigen Geräte sind nur wenig leistungsfähig. Inzwischen ist die industrielle Herstellung von Filtermembranen weiter fortgeschritten, die modernen Zentrifugen sind wesentlich leistungsfähiger geworden. Diesen Bedingungen angepasst, wurde das folgende Gerät[1] konstruiert:

Prinzip[2]. 1 cm³ Wasser übt bei einer Schichthöhe von 1 cm unter Normalbedingungen auf die Grundfläche von 1 cm² einen Druck von 1 g aus. In mittlerer Höhe der Einsatzbecher entsteht in einer üblichen Laborzentrifuge bei 3000 U/min ein Schwerefeld von zum Beispiel 1500 g (Erdbeschleunigung). Der Druck bei 1 cm Schichthöhe steigert sich unter diesen Bedingungen auf 1500 g/cm².

Es ergibt sich zur Berechnung der durch die Flüssigkeitssäule entstehenden Drucke unter Normalbedingungen die allgemeine Formel:

$$\frac{\text{Schichthöhe in cm} \cdot \text{Vielfaches von g}}{1000} = \text{Druck in at.}$$

Bei 1500 g und einer Schichthöhe von 7 cm, wie sie bei dem abgebildeten Filter möglich ist, beträgt der Druck

$$\frac{7 \cdot 1500}{1000} = 10{,}5 \text{ at.}$$

Lässt man den Druck statt auf den Boden des Zentrifugenbechers auf eine geeignete Filtermembran wirken, so treibt sich die überstehende Lösung durch ihr eigenes Gewicht selbst durch das Filter hindurch. Der entstehende Zentrifugaldruck z errechnet sich aus der zentrifugierten Masse m, dem mittleren Radius des Umlaufkreises der zentrifugierten Masse r und der Winkelgeschwindigkeit v nach:

$$z = m \cdot r \cdot v^2.$$

Die Winkelgeschwindigkeit ist abhängig von der für einen Umlauf benötigten Zeit t:

$$v = \frac{2\pi}{t}.$$

Demnach ist

$$z = \frac{m \cdot r \cdot 4\pi^2}{t^2}.$$

Beschreibung des Gerätes. Zusammengesetzt (Abb. 1) kann das Zentrifugenfilter in den Becher einer normalen Zentrifuge eingestellt werden. Das hier dargestellte Modell passt in seinen Abmessungen (3 × 3 × 11 cm) in einen 50-cm³-Zentrifugenbecher. Es ist in allen Teilen aus V2A-Stahl hergestellt.

In den treppenförmig ausmündenden Boden des Filteraufsatzes (*2* in Abb. 2) ist eine starke Siebplatte (*6*) eingepasst, darüber ruht ein sehr engmaschiges Drahtnetz (*5*) so, dass seine Oberfläche im Niveau des oberen Innenrandes steht (siehe Querschnitt in Abb. 1). Die daraufliegende Filtermembran (*4*) erhält so eine plane und durchlässige Auflagefläche. In den Filteraufsatz ist ein Innenzylinder (*3*) saugend eingepasst, er ruht unten auf dem Aussenrand der Filterschicht. Seine Kanten sind abgerundet, um die Filterschicht nicht zu verletzen und um durch Verkleinerung der Auflagefläche den Auflagedruck zu erhöhen. Da sein spezifisches Gewicht grösser ist als das der Lösung, ist auch während des Zentrifugierens ein Auspressen der Lösung nach den Seiten unmöglich. Der Innenzylinder steht über den Oberrand des Filteraufsatzes etwas über, er wird durch den Schraubdeckel (*1*) fest auf die Membran gedrückt. Der Deckel ist zum Einfüllen der Lösung nach dem Zusammensetzen des Filters oben durchbrochen. Der zusammengesetzte Filteraufsatz wird auf einen getriebenen V2A-Stahl-Becher (*7*) aufgeschraubt, in dem sich das Filtrat sammelt.

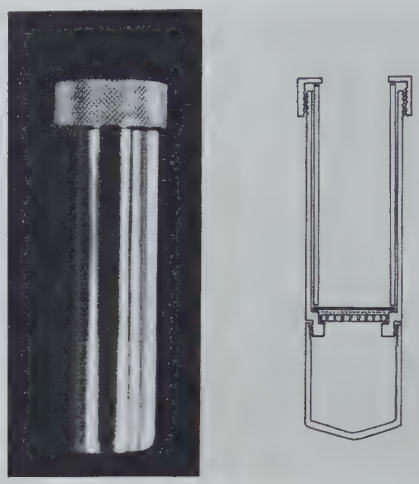


Abb. 1

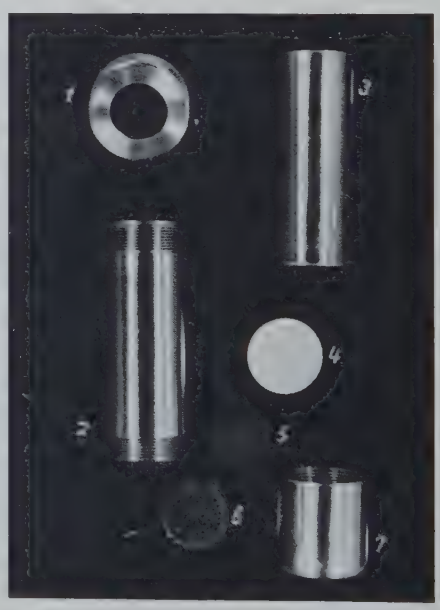


Abb. 2

Da der entstehende Zentrifugaldruck nach obiger Formel vom Radius des Umlaufkreises der zentrifugierten Masse abhängt, ist es nicht möglich, das Filtergerät einfach mit einem wassergefüllten Zentrifugenröhrchen auszutarieren. Man benutzt am besten zwei Zentrifugenfilter in gegenüberliegenden Einhängebechern; kräftigere Zentrifugen, wie die der Firma Stock, Marburg, vertragen das Austarieren mit einem V2A-Stahl-Becher, den man mit Tarierschrot gewichtsgleich macht.

[1] DBGM. Nr. 1647740 vom 1. Oktober 1952.– Vgl. neuerdings H. Metzner, Naturwissenschaften *40*, 388 (1953).

[2] Herrn Dr. Thellung, Institut für theoretische Physik an der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich, danke ich für Durchsicht und Beratung.

Gebrauch. Das hier beschriebene Modell hat bei maximal 7 cm Schichthöhe ein Fassungsvermögen von 35 cm^3. Für kleinere Mengen muss der Durchmesser des Innenzylinders verkleinert werden, wobei zur Erhaltung des Filtrationsdruckes die Höhe der Flüssigkeitssäule möglichst gross gewählt werden soll. In schnell laufenden Zentrifugen können beträchtliche Drucke erreicht werden, bei 5 cm Schicht und 5000 g zum Beispiel 25 at. usw. Die Filtrationsgeschwindigkeit ist ausser von der Eigenart der zu filtrierenden Flüssigkeit und der gewählten Filterart vom Filtrationsdruck abhängig.

Grundsätzlich sind alle üblichen Filterpapiere und -membranen verwendbar. Um Einrisse in empfindlichen Schichten zu vermeiden, unterlegt man sie zweckmässig mit einer stärkeren, aber durchlässigeren Filterpappe (zum Beispiel Filterpappe 1122 von Schleicher und Schüll; C-Karton der Membranfiltergesellschaft, Göttingen). Mit einer der käuflichen Membranfilterschichten kommt man gewöhnlich zum Ziel. Für die Filtration mit organischen Lösungsmitteln sind die Cella- und Ultracella-Filter geeignet (vgl. Kratz[1]). Statt der Ultrafeinfilter kann man auch nach dem Vorgehen von Wo. Ostwald[2] und Krogh und Nakazawa[3] Kollodiummembranen herstellen, deren Porenweite durch Verdünnung der benutzten ätherischen Kollodiumlösung bzw. durch Beimischung von Glyzerin (Schoep[4]) in Grenzen variiert werden kann. Wir giessen die Membranen auf gewöhnlichen dünnen Filterpapieren (zum Beispiel 595 von Schleicher und Schüll) und unterlegen sie im Zentrifugenfilter mit einem C-Karton. Die Membranfilter können abgewaschen und mehrfach benutzt werden, doch nimmt ihre Durchlässigkeit bei der Benutzung langsam ab.

Anwendungsmöglichkeiten. Das Gerät ist ganz allgemein zum Abfiltrieren auch feinster Niederschläge von Homogenaten usw. geeignet, ferner zum Eiweissfreifiltrieren von biologischen Flüssigkeiten (vgl. Thiessen[1]) oder zur «fraktionierten Ultrafiltration» (Grabar[2]; Elford und Ferry[3]), in der Bakteriologie etwa zur Anreicherung von Tuberkelbakterien nach dem Vorgehen von Escher[4], Kröger und Beling[5] und Tietz und Ehle[6] oder zur Bestimmung des Colititers (vgl. Schütz und Kruse[7]), ferner zum Keimfreifiltrieren nicht erhitzbarer pharmazeutischer Lösungen (Eschenbrenner[8]), zur Schnellfiltration ganz allgemein usw. Bei entsprechender Einrichtung des Gerätes ist das Arbeiten mit grossen wie mit sehr kleinen Volumina möglich.

W. Keup

Medizinische Universitätsklinik Zürich, den 26. Mai 1954.

Summary

A filter apparatus for high pressure filtration and its use in normal centrifuges is described. The solution is filtered through a filter membrane under the influence of high centrifugal power.

[1] E. Kratz, Z. angew. Chem. *39*, 1601 (1926).
[2] Wo. Ostwald, *Kleines Praktikum der Kolloidchemie* (Th. Steinkopf, Leipzig 1943).
[3] A. Krogh und F. Nakazawa, Biochem. Z. *188*, 241 (1927).
[4] A. Schoep, Koll. Z. *8*, 80 (1911).
[1] A. Thiessen, Biochem. Z. *140*, 457 (1923).
[2] P. Grabar, C. r. Soc. Biol., Paris *116*, 70 (1936).
[3] W. J. Elford und J. D. Ferry, Biochem. J. *28*, 650 (1934).
[4] W. E. Escher, Z. Inf.-Krankh. Haustiere *32*, 77 (1927).
[5] E. Kröger und A. Beling, Z. Hyg. *129*, 32 (1949).
[6] C. J. Tietz und G. Ehle, Klin. Wschr. *28*, 373 (1950).
[7] F. Schütz und H. Kruse, Klin. Wschr. *22*, 520 (1943).
[8] H. Eschenbrenner, Pharm. Z., Nr. 6 (1933).

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Planen und Auswerten von Versuchen

Eine Einführung für Naturwissenschafter, Mediziner und Ingenieure

Von Arthur Linder

182 Seiten

(Verlag Birkhäuser, Basel und Stuttgart 1953)
(Gebunden sFr. 21.–, broschiert sFr. 17.50)

Dem Verfasser werden alle diejenigen besonders dankbar sein, die zwar längst von der Nützlichkeit rationeller Versuchsplanung und -auswertung überzeugt sind, jedoch die modernen statistischen Verfahren entweder gar nicht oder lediglich als Rezepte benutzen konnten, weil ihnen bisher keine ausführliche, auch dem Nichtmathematiker einleuchtende Darstellung der Grundlagen und Anwendungen dieser Methoden zugänglich war. Hier füllt das neue Buch Linders eine Lücke aus. Von einfachen zu komplizierteren Fällen fortschreitend, werden die verschiedenen Typen von Versuchsanordnungen, die Auswertung der mit ihrer Hilfe erhaltenen Ergebnisse und der durch ihre Anwendung erzielte Gewinn an Ergiebigkeit und Genauigkeit der Versuche eingehend erläutert. Zahlreiche Beispiele aus der wissenschaftlichen und technischen Forschung illustrieren das Gesagte oder bilden den Ausgangspunkt der Darstellung, die zudem häufig durch eine allgemein gehaltene Formulierung der behandelten Probleme bereichert wird. Eine Aufzählung der besprochenen Versuchstypen erübrigt sich. Es genüge der Hinweis, dass der im Titel genannte Personenkreis nur selten Fragen begegnen wird, die über den Rahmen des Buches hinausgehen. Besonders hervorstechende Beispiele für die mit einfachsten Mitteln überzeugende Klarheit der Darstellung sind die Abschnitte über Gehaltsbestimmung durch Vergleich mit Standard und über die Aufteilung von Streuungen auf einzelne Freiheitsgrade durch orthogonale Vergleiche, die wohl in keinem andern Werk so ausführlich und leicht verständlich erklärt werden. Als besonderes Verdienst ist es dem Verfasser anzurechnen, dass er, abweichend von der verbreiteten Tendenz, englische Fachausdrücke, in Anführungszeichen gesetzt, einfach zu übernehmen, sich erfolgreich darum bemüht hat, eine zweckmässige und treffende deutsche Terminologie zu schaffen. H. Borth

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIORUM PROGRESSUS

On the Enzymatic Exchange of the Sulphate Group of the Animal Sulpho-Mucopolysaccharides

By H. Boström and E. Jorpes, Stockholm[1]

INTRODUCTION

Among the acid mucopolysaccharides, those esterified with sulphuric acid, the sulpho-mucopolysaccharides, constitute an important group with a wide distribution in the body. Thus, chondroitin sulphuric acid is one of the main constituents of the hyaline cartilage. It is also present in the aortic wall, in tendons, sclera, and the dermal connective tissue. Mucoitin sulphuric acid is claimed to occur in the gastric mucosa[2]. Hyaluronosulphate[3] is also claimed to be present in the cornea. Heparin[4] has been found to be a specific mucopolysaccharide produced by the mast cells.

During the past few years, additional knowledge of the metabolism of the sulpho-mucopolysaccharides has been gained, by means of studies of the *sulphate exchange* in these compounds with the isotope technique. S^{35}-labelled sulphate has been used as the tracer substance (Dziewiatkowski *et al.*[5], Layton *et al.*[6], Boström *et al.*[7] and others).

In the present paper, a short survey is given of the recent developments in this field with particular reference to the work performed in Scandinavia.

IN VIVO STUDIES

Excretion of S^{35}

If a tracer dose of S^{35} as *sodium sulphate* is given to an experimental animal, most of the radioactive sulphur is rapidly excreted[8]. According to Dziewiatkowski[9], 95 per cent of the S^{35} given to rats is excreted in the urine and faeces during the first 5 days. The concentration of inorganic sulphate in the tissues decreases rapidly. Only a small proportion of the S^{35} excreted occurs as ethereal sulphates[9].

Sulphate fixation

Numerous investigations have been made to determine the exact localization of that part of the S^{35}-labelled sulphate retained in the tissues of the experimental animals. Thus, Singher and Marinelli in 1945[1] reported a higher sulphate fixation in the bone marrow than in the rest of the bone. Dziewiatkowski *et al.* showed in 1949[2] a high sulphate incorporation and a slow elimination in cartilage, bone and bone marrow; this was in sharp contrast to the low sulphate uptake and rapid elimination in the blood, liver and brain.

The autoradiographic method has proved to be eminently suitable for ascertaining the exact localization of several radioactive tracers, even in relatively small structures. By means of this technique, the sulphate fixed in articular and epiphyseal cartilage of suckling rats was made visible by Dziewiatkowski[3] and in the cartilage of the nasal septum of adult rats by Campbell and Persson[4]. Together with Odeblad, the present authors have used the autoradiographic method for a systematic study of the sulphate fixation in a large number of normal tissues and organs in rats and rabbits given injections of S^{35}-labelled sulphate. A brief account of the results of these investigations, which have already been published in various journals, will now be given.

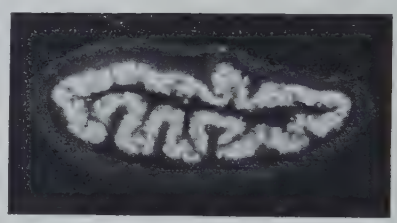


Fig. 1.–Autoradiograph of ileum from an adult rabbit 24 h after an intravenous injection of S^{35}-labelled sodium sulphate. × 25.

In the *respiratory tract*, the highest sulphate fixation took place in the tracheal and bronchial cartilage and in the cartilage plates of the lung[5]. The tracheal epithelium and the respiratory epithelium of the lung showed a low or moderate uptake, whereas the S^{35} content of the lymphatic follicles was extremely low.

All sections of the *gastrointestinal tract* investigated[5] (distal part of the oesophagus, fundus ventriculi, duodenum, distal part of the ileum and descending colon) showed the highest degree of sulphate fixation in the epithelial layer (Fig. 1). In other layers of the oesophagus, stomach and intestines and in the *liver* and *pancreas* a diffuse, low or moderate S^{35} uptake was noted.

In the *cardiovascular system*[5], the highest S^{35} incorporation occurred in the aorta and in the heart valves. The *heart muscle* and *the spleen*, on the other hand, showed only a moderate, diffuse uptake.

In the *nervous system*, a locally differentiated but fairly low S^{35} incorporation was demonstrated[6]. In general, a considerably higher uptake was found in the

[1] From the Chemistry Department II, Karolinska Institutet, Stockholm.

[2] P. A. Levene, *Hexosamines and Mucoproteins* (Longmans, Green & Co., London, 1925).

[3] K. Meyer and E. Chaffee, Amer. J. Ophtalmol. *23*, 1320 (1940).

[4] H. Holmgren and O. Wilander, Z. mikrosk.-anat. Forsch. *42*, 242 (1937). – E. Jorpes, H. Holmgren, and O. Wilander, Z. mikrosk.-anat. Forsch. *42*, 279 (1937).

[5] D. D. Dziewiatkowski, R. E. Benesch, and R. Benesch, J. Biol. Chem. *178*, 931 (1949).

[6] L. L. Layton *et al.*, Cancer *3*, 725 (1950).

[7] H. Boström, Arkiv Kemi *6*, 43 (1953).

[8] H. Borsook, G. Keighley, D. M. Yost, and E. Y. McMillan, Science *86*, 525 (1937). – D. D. Dziewiatkowski, J. Biol. Chem. *178*, 197 (1949).

[9] D. D. Dziewiatkowski, J. Biol. Chem. *178*, 389 (1949).

[1] H. O. Singher and L. Marinelli, Science *101*, 414 (1945).

[2] D. D. Dziewiatkowski, R. E. Benesch, and R. Benesch, J. Biol. Chem. *178*, 931 (1949). – D. D. Dziewiatkowski, J. Biol. Chem. *178*, 197 (1949).

[3] D. D. Dziewiatkowski, J. Exptl. Med. *93*, 451 (1953).

[4] D. Campbell and H. Persson, Exper. *7*, 304 (1951).

[5] E. Odeblad and H. Boström, Acta Pathol. Microbiol. Scand. *31*, 339 (1952).

[6] H. Boström and E. Odeblad, Acta Psychiatr. Neurol. Scand. *28*, Fasc. 1 (1953).

grey than in the white matter in all nervous tissues investigated. In the *cerebrum*, a particularly high uptake was noted in a cortical layer consisting of polymorphous and fusiform cells. In the *cerebellar cortex*, the molecular layer and the PURKINJE cells showed a moderate uptake. In the granular layer of the *cerebellum*, on the contrary, a considerable S^{35} uptake was noted. Finally, in the *choroid plexus*, there was a very high S^{35} incorporation.

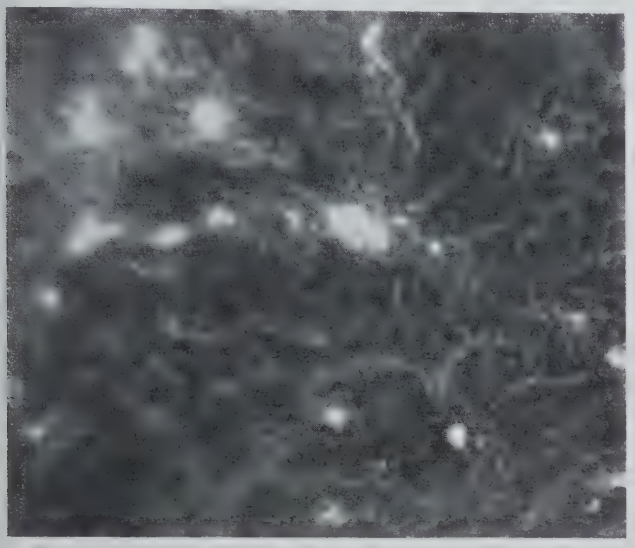


Fig. 2.–Stripping film autoradiograph showing S^{35}-incorporation in the mast cells of the subcutis of young rats 5 days after the injection of S^{35}-labelled sodium sulphate. × 200.

In the autoradiographs of the *eye*[1], a high S^{35} content appeared, corresponding to the cornea and sclera, while the vitreous body contained no S^{35}.

The *skin*[2], finally, showed a low uptake of S^{35} in the cornified layer. In the corium, a smooth distribution of somewhat more S^{35} was observed, interrupted by the pictures of hair follicles and small vessels, which showed a still higher concentration of S^{35}. A remarkably high sulphate fixation occurred in the *mast cells*[1] (Fig. 2) of the subcutis, contrasting to the extremely low sulphate fixation in other parts of this layer.

Fig. 3.–Autoradiograph of a three week old rabbit foetus, whose mother was killed 16 h after having received an intravenous injection of S^{35}-labelled sodium sulphate.

According to the findings of LAYTON and co-workers[2], maternal sulphate is utilized by mammalian embryos. In order to study the S^{35} distribution in embryonal tissues, rabbit foetuses, about 29 mm in length, of which the mother was sacrified 16 h after having received an injection of S^{35}-labelled sodium sulphate, were subjected to autoradiographic examination[3]. Well-differentiated autoradiographs were obtained, indicating that the S^{35} incorporation varied markedly in different tissues (Fig. 3). Thus a very high uptake was noted in all *cartilage structures*. In the *aorta* a considerable fixation of the isotope was noted; and other tissues, e.g. foetal *lungs, intestines, tongue, dental papilla* of a presumptive tooth, *cardiac valves*, also showed a fairly high S^{35} incorporation. On the other hand, no or very little S^{35} was fixed in the liver and in the brain.

Mode of sulphate fixation

DZIEWIATKOWSKI and co-workers[4] assumed that the high S^{35} incorporation, demonstrated by them in 1949, in the cartilage of suckling rats after the intraperitoneal administration of S^{35}-labelled sodium sulphate mainly indicated an incorporation of the radioactive sulphur in the sulphate group of condroitin sulphuric acid. In a later investigation, DZIEWIATKOWSKI[5] made an attempt to isolate this labelled chondroitin sulphate from the cartilage, after adding large amounts of non-labelled chondroitin sulphuric acid as a carrier. The aforementioned conception has been verified in our laboratory by the isolation of protein-free labelled chondroitin sulphuric acid from the costal cartilage and skin of adult rats given injections of S^{35}-labelled sulphate.

Isolation from the same animals of other sulphur-containing compounds, such as cystine, taurine and methionine, showed, however, only a low or non-ap-

Table I

A comparative study of the S^{35}-incorporation in chondroitin sulphuric acid prepared from cartilage and in taurine, cystine and methionine prepared from the liver of adult rats after a single injection of S^{35}-labelled sodium sulphate.

Substance	Radioactivity in counts/min/cm² at differ. times after inj.			
	2 h	8 h	24 h	48 h
Chondroitin sulphuric acid isolated from the costal cartilage	1392	2136	2953	2933
Taurine isolated from the liver	32	68	53	35
Methionine isolated from the liver	—	—	3	—
Cystine isolated from the liver	—	—	4	—

[1] E. ODEBLAD and H. BOSTRÖM, Acta Pathol. Microbiol. Scand. *31*, 339 (1952).

[2] H. BOSTRÖM, E. ODEBLAD, and U. FRIBERG, Acta Pathol. Microbiol. Scand. *33*, Fasc. 4 (1953).

[1] E. JORPES, E. ODEBLAD, and H. BOSTRÖM, Acta Haematol. *9*, 273 (1953).

[2] L. L. LAYTON, Arch. Biochem. Biophys. *28*, 142 (1950).

[3] H. BOSTRÖM and E. ODEBLAD, Anat. Record. *115*, 505 (1953).

[4] D. D. DZIEWIATKOWSKI, R. E. BENESCH, and R. BENESCH, J. Biol. Chem. *178*, 931 (1949).

[5] D. D. DZIEWIATKOWSKI, Biol. Chem. *189*, J, 187 (1951).

preciable uptake[1] (Table I). On the other hand, labelled sulphate can be found in ethereal sulphates, as demonstrated by Laidlow and Young[2].

The greatest incorporation of S^{35} takes place in those tissues and organs in which sulpho-mucopolysaccharides are present. Thus, on the autoradiograph, chondroitin sulphuric acid can be seen in, for example, various kinds of cartilage, in the aortic wall and in the chondroid substance of the heart valves. On the other hand, the marked density of the mast cells visible on the autoradiograph must be considered to correspond to the S^{35} incorporated in heparin or in its precursors. The high uptake of S^{35} in the cornea and sclera affords evidence of an incorporation in the sulpho-mucopolysaccharides that are known to occur in these membranes. In the vitreous body, on the contrary, which contains the non-esterified hyaluronic acid, no uptake of S^{35} can be noted. The uptake of S^{35} in the gastro-intestinal tract must be ascribed mainly to an incorporation in a possible mucoitin sulphuric acid. Since, however, the intestinal tract is known to be the main extrahepatic source of phenol conjugation[3], the possibility that some of the S^{35} present in the intestinal mucosa occurs as ethereal sulphates cannot be ruled out.

The renewal of the sulphate group of chondroitin sulphuric acid

In order to study the rate of the sulphate exchange in the sulpho-mucopolysaccharides, the following experiment was performed[4]:

Adult white rats were given intraperitoneal injections of S^{35}-labelled sodium sulphate. 9 groups of animals, each comprising 20 rats, were used. The groups of animals were sacrified at different times after the injection, the first group after 2 h and the last after 16 days. The blood of all the animals in a group was pooled, as were the ribs with the intercostal muscles and the livers. Chondroitin sulphuric acid was prepared from the costal cartilage by applying on a small scale the method of Jorpes[5], as modified by Strandberg[6]. The different preparations of chondroitin sulphuric acid obtained were hydrolyzed in hydrochloric acid and the sulphate precipitated as $BaSO_4$ for measurements of the radioactivity. The inorganic sulphate of the intercostal muscles was extracted and precipitated as $BaSO_4$ and the total sulphur of the blood was transformed into sulphate by oxidizing with sodium peroxide before the precipitation as $BaSO_4$.

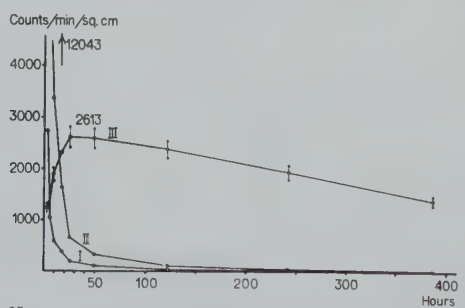


Fig. 4.–S^{35}-incorporation in the cartilage of adult rats. Curve I total sulphur in blood. Curve II free sulphates in the costal muscles, Curve III the chondroitin sulphuric acid. The errors in measurements are marked on curve III.

[1] H. Boström and S. Åqvist, Acta Chem. Scand. *6*, 1557 (1952).
[2] J. C. Laidlaw and L. Young, Biochem. J. *42*, Proc. 1 (1948).
[3] R. T. Williams, *Detoxication Mechanisms* (John Wiley, New York, 1947), p. 70.
[4] H. Boström, J. Biol. Chem. *196*, 477 (1952).
[5] E. Jorpes, Biochem. Z. *204*, 354 (1929).
[6] L. Strandberg, Acta Physiol. Scand. *21*, 222 (1950).

The different samples of $BaSO_4$ originating from the sulphate sulphur of chondroitin sulphuric acid of cartilage, the inorganic sulphate of intercostal muscles and the total sulphur of the blood were plated and the radioactivity measured by means of a Geiger-Müller counter. The results of this experiment are shown in Figure 4. Contrary to the rapid decrease in the radioactivity of the total sulphur fraction and the inorganic sulphur fraction (Curves I and II, respectively), the radioactivity of the ester sulphate group of chondroitin sulphuric acid (Curve III) showed an increase to a maximum value at 24 h after the injection, followed by a decrease during the whole time of observation. From the descending part of this curve the biological half-life-time of the sulphate group of chondroitin sulphuric acid in the cartilage of adult rats could be estimated to be about 16 days. In a similar way the approximate biological half-life-time of the ester sulphate of chondroitin sulphuric acid prepared from the skin of the same rats was estimated to be 8–9 days (Fig. 5, Curve I).

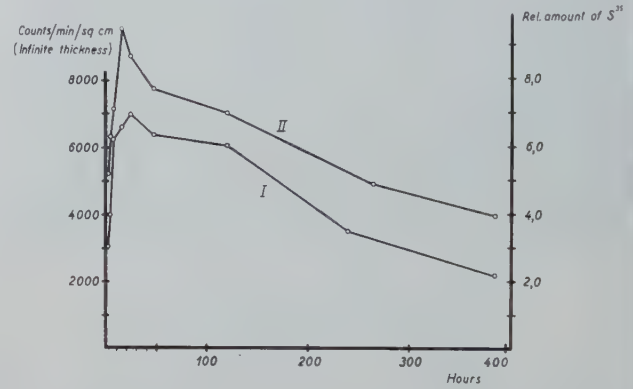


Fig. 5.–Uptake and elimination of S^{35} from the skin of adult rats after a single injection of S^{35}-labelled sodium sulphate. Curve I. The radioactivity of the sulphate group of the isolated chondroitin sulphuric acid. Curve II. The radioactivity in the corium as estimated by quantitative autoradiography.

In another experiment[1], four rats from the same litter were given injections of S^{35}-labelled sodium sulphate. At different intervals of time a piece of skin was excised from the dorsal area of each rat. All the specimens were subjected to autoradiography, using X-ray film, and the relative amounts of S^{35} fixed in the corium layer of the skin were estimated by means of quantitative autoradiography according to Odeblad[2]. When the curve obtained in this way (Fig. 5, Curve II) was compared with the curve for the radioactivity in the ester sulphate group of chondroitinsulphuric acid isolated from the skin, both curves were found to follow each other quite closely (Fig. 5).

Factors influencing the sulphate exchange in vivo

The uptake of S^{35} seems to be higher in foetuses and young growing animals than in adult ones. Here it is a question not only of the ordinary sulphate exchange in the sulpho-mucopolysaccharides, but also of an accumulation of newly synthesized material. In accordance herewith, the S^{35} fixation in chondrosarcomatous tissues has been found to be higher than in the cartilage (Gottschalk and Allen[3]).

[1] H. Boström, E. Odeblad, and U. Friberg, Acta Pathol. Microbiol. Scand. *33*, Fasc. 4 (1953).
[2] E. Odeblad, Acta Radiol. Suppl. 93 (1952).
[3] R. Gottschalk and H. Allen, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. *80*, 334 (1952).

According to DZIEWIATKOWSKI[1] the treatment of rats with thyroxin increases the sulphate fixation in the tissues. On the other hand, it has been shown that the administration of cortisone to animals reduces the speed of the sulphate fixation in the tissues, probably reflecting an actual decrease in the rate of renewal of the sulphate groups in the sulpho-mucopolysaccharides[2]. Such a slow sulphate exchange has recently been found by REDDI and NORSTRÖM[3] to occur in scorbutic animals. Certain salicylates also exert a similar retarding effect[4].

IN VITRO EXPERIMENTS

Methods

LAYTON *et al.*, using a tissue culture technique, made a series of *in vitro* studies of the sulphate fixation in a number of tissues[5]. They found a highly differentiated fixation in embryonic chick tissues and a greater retention of sulphate in granulation tissue and injured muscle tissue from healing wounds than in corresponding normal tissues.

Since we found that slices of cartilage take up free sulphates from the surrounding medium as well, a technique for studying the sulphate exchange *in vitro* was elaborated in our laboratory[6]. The technique was as follows:

Fresh costal cartilage from newly killed calves was cut in thin slices. 5 g portions of the slices were then incubated in a Krebs-Ringer-bicarbonate solution containing S^{35}-labelled sodium sulphate at a temperature of 37°C in the presence of a gas mixture containing oxygen and carbon dioxide. After a few hours the reaction was stopped by boiling the samples. Chondroitin sulphuric acid of a high degree of purity was then isolated from the cartilage according to a simplified small-scale method. The contaminating inorganic sulphates were removed by passing the samples through an anion exchange column. After splitting off the ester sulphate by acid hydrolysis and precipitating as $BaSO_4$, the radioactivity of the sample was measured in a GEIGER-MÜLLER counter. The figures for the uptake of radioactive sulphate obtained in parallel experiments agreed fairly well with a standard deviation amounting to 3–4 per cent in a double determination. No corresponding S^{35} incorporation took place in 24 h when sodium sulphate labelled with S^{35} was added to pure chondroitin sulphuric acid alone.

The S^{35} incorporation in the slices

The S^{35} incorporation in chondroitin sulphuric acid increased with the time of incubation. During the first two hours of incubation, the S^{35} incorporation seemed to be more rapid than subsequently. In the interval 2 h–24 h, there seemed to be a linear relationship between the incorporation of S^{35} and the time of incubation (Fig. 6).

The ability of the cartilage to incorporate sulphate ions remained fairly constant during the first 10 h after the slaughter, if the material was kept in an ice-box at a temperature of +4°C. After that time a slow reduction in activity was noticed. On the other hand, if fresh cartilage was frozen and then thawed before incubation, no S^{35} uptake occurred in the slices; this agrees with the findings of LAYTON and co-workers. Homogenization in a small blender also destroyed the activity, as did heating of the slices to 47°C.

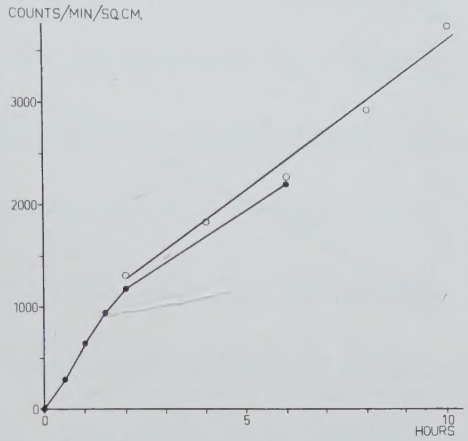


Fig. 6.–The S^{35}-uptake in the sulphate group of chondroitin sulphuric acid of the cartilage *in vitro* as a function of the time of incubation.

A considerably higher uptake was noted in slices of medium thickness (0·25–0·50 mm) than in thin and thick slices. There was an increase in the S^{35} incorporation with an increase in temperature until heat inactivation occurred. A considerably slower uptake took place when the bottles were aerated by a nitrogen-carbon dioxide mixture instead of the ordinary oxygen-carbon dioxide mixture.

Inhibition of the S^{35} incorporation

In order to obtain more information on the process leading to incorporation of sulphate in the cartilage, the effect of several more or less "group-specific" enzyme inhibitors was systematically studied in *in vitro* experiments. Most of the reagents employed were dissolved directly in Krebs-Ringer-bicarbonate solution; the acid reagents were brought to pH 7·4 before use. A few water-insoluble reagents were dissolved in ethanol, which in small amounts had no significant effect on the process to be studied. The inhibitors were added to the slices suspended in Krebs-Ringer-bicarbonate solution half an hour before addition of the isotope.

The results of the experiments presented in Table II showed that a moderate degree of inhibition was brought about by many of the substances, *e.g.* hydroxylamine, semicarbazide, potassium cyanide, sodium azide, thiourea, and formalin. Among the inhibitors tested, however, the SH inhibitors such as arsenicals, mercurials, iodosobenzoate, monoiodoacetic acid, copper ions and selenite were found to be the most effective. The inhibitions caused by mercurials and iodobenzoate could to some extent be prevented by glutathione.

Effect of cortisone and salicylates

Cortisone was among the other substances tested. According to LAYTON's findings[1], this substance reduces the fixation of S^{35} in various tissues, an observation which we have confirmed in our experiments[2]. Cortisone in the form of cortisone alcohol was dissolved directly in the Krebs-Ringer-bicarbonate solution. It proved to have a strongly inhibiting effect on the sulphate ex-

[1] D. D. DZIEWIATKOWSKI, J. Biol. Chem. *189*, 717 (1951).
[2] L. L. LAYTON, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. *76*, 596 (1951). – H. BOSTRÖM and E. ODEBLAD, Arkiv Kemi *6*, 39 (1953).
[3] K. REDDI and A. NORSTRÖM, (Unpublished observation).
[4] H. BOSTRÖM and B. MÅNSSON, Unpublished observation.
[5] L. L. LAYTON *et al.*, Cancer *3*, 725 (1950).
[6] H. BOSTRÖM and B. MÅNSSON, Arkiv Kemi *6*, 23 (1953).

[1] L. L. LAYTON, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. *76*, 596 (1951).
[2] H. BOSTRÖM and B. MÅNSSON, Arkiv Kemi *6*, 23 (1953).

change in chondroitin sulphuric acid of the cartilage *in vitro*. With a concentration of $2{\cdot}8 \times 10^{-4}$ M per liter (10 mg per cent) the inhibition amounted to 35 per cent

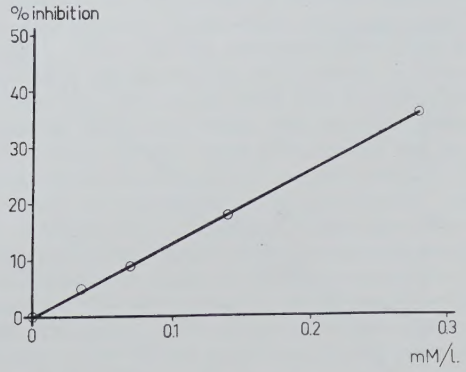


Fig. 7.–Effect of cortisone alcohol on the S^{35}-incorporation in chondroitin sulphuric acid in slices of cartilage *in vitro*.

(Fig. 7). Of the substances hitherto tested, only the SH reagents proved to be more powerful inhibitors. A very similar effect *in vitro* was obtained with salicylates.

Stimulation of the S^{35} incorporation

It was recently found in our laboratory that the process studied could not only be inhibited by different agents but could also be stimulated in different ways.

Thus, the presence of glucose (0·1 %) in the suspension medium gave an S^{35} incorporation in the samples of chondroitin sulphuric acid of cartilage which was 15–20 per cent higher than that in samples incubated according to the standard method, without the addition of glucose to the Krebs-Ringer-solution.

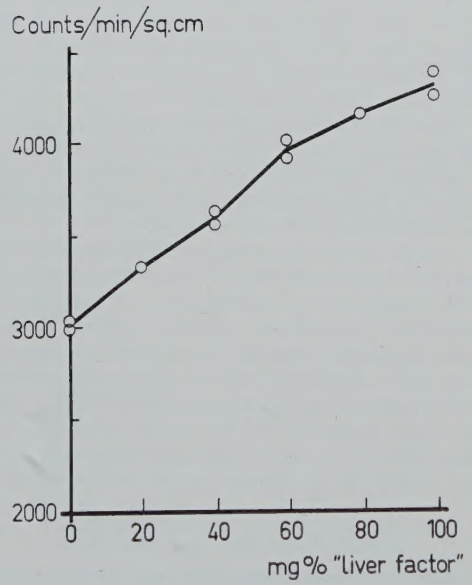


Fig. 8.–Stimulating effect on the S^{35}-incorporation in slices of cartilage *in vitro* by a crude preparation of the "liver factor".

A stimulation of quite another order of magnitude was, however, obtained when small amounts of a liver homogenate were added to the slices[1]. In this case, radioactivity exceeding that of the control samples by more than 100 per cent was noted. In further experiments it was shown that the active principle is present in the liver extract. It is thermostable and can be dialyzed through a cellophane bag.

Table II

Effect of some enzyme inhibitors on the S^{35} uptake by slices of cartilage *in vitro*.

Inhibitor	Concentration of inhibitor M/l	Per cent inhibition
*Metal enzyme inhibitors**		
Potassium cyanide	$8{\cdot}0 \times 10^{-3}$	53
Sodium azide	$8{\cdot}0 \times 10^{-3}$	72
Thiourea	$8{\cdot}0 \times 10^{-3}$	12
8-hydroxyquinoline	$8{\cdot}0 \times 10^{-4}$	75
*Carbonyl group reagents**		
Hydroxylamine	$8{\cdot}0 \times 10^{-3}$	95
Semicarbazide	$8{\cdot}0 \times 10^{-3}$	42
Sodiumbisulphite	$8{\cdot}0 \times 10^{-4}$	39
Phenylhydrazine	$8{\cdot}0 \times 10^{-4}$	67
Potassium cyanide	$8{\cdot}0 \times 10^{-3}$	53
Dimedon	$8{\cdot}0 \times 10^{-3}$	0
*Sulphuric group reagents**		
Iodosobenzoate	4×10^{-4}	50
Iodoacetate	6×10^{-5}	50
Phenylmercuric nitrate	2×10^{-5}	50
p-Chloromercuric benzoate	4×10^{-5}	50
Lewisite	8×10^{-6}	50
Diphenylchloroarsine	8×10^{-6}	50
Sodium arsenite	$8{\cdot}0 \times 10^{-4}$	88
Sodium selenite	$8{\cdot}0 \times 10^{-5}$	46
Copper chloride	$8{\cdot}0 \times 10^{-4}$	79
Chloroacetophenone	$5{\cdot}0 \times 10^{-5}$	66

* Type of inhibitor.

The result of a typical experiment showing the increase in the sulphate exchange caused by different amounts of the "liver factor" is recorded in Figure 8.

Zusammenfassung

Es wird über Versuche zur Bestimmung des enzymatischen Umsatzes der Sulfatgruppe von Mucopolysacchariden mit Hilfe von S^{35}-Sulfat berichtet. Letzteres ist in hohen Konzentrationen im Knorpel, in den Schleimhäuten, in der Intima aortae und in den Gewebsmastzellen nachweisbar. Das Ausmass dieser Sulfatfixierung kann entweder auf Grund von Organen isolierter Chondroitinschwefelsäure oder nach der Intensität der Schwärzung des autoradiographischen Bildes bestimmt werden.

S^{35}-Sulfat wird von dünnen Knorpelschnitten auch aus einer Lösung aufgenommen, womit das Studium des Umsatzes der Sulfatgruppen *in vitro* möglich ist. Durch Einfrieren, Homogenisieren oder Erhitzen des Knorpels auf 47°C wird seine diesbezügliche fermentative Aktivität zerstört. Der Umsatz der Sulfatgruppen wird besonders stark durch SH-Inhibitoren und auch durch Cortison gehemmt. Zusatz von Leberextrakt bewirkt eine hochgradige Stimulierung der Sulfatveresterung durch einen dialysierbaren und thermostabilen Aktivator.

[1] H. Boström and B. Månsson, Acta Chem. Scand. 1953 (in print).

Die Erforschung der Wirkstoffe des Mutterkorns beschäftigte namhafte Chemiker und Apotheker während Jahrzehnten. Einen ersten Markstein bedeutete die Entdeckung und Reindarstellung des Alkaloids Ergotamin in den Laboratorien der Sandoz A.G., wo in der Folge auch die Auffindung und Herstellung weiterer für die Medizin äusserst wertvoller Mutterkorn-Reinalkaloide gelang. Neue therapeutische Aspekte eröffnete die erstmals bei Sandoz erfolgte Hydrierung dieser Stoffe. Folgende Präparate sind das Ergebnis dieser Forschungen:

Cafergot

Dihydroergotamin-Sandoz

Gynergen

Hydergin

Methergin

Neo-Gynergen

Partergin

SANDOZ

S A N D O Z A. G.

Im Oktober 1954 erscheint *völlig neubearbeitet* die 8. Auflage von:

F. A. HENGLEIN

Grundriss der Chemischen Technik

Ein Lehrbuch für Studierende der Chemie und des Ingenieurfaches
Ein Übersichtsbuch für Chemiker und Ingenieure im Beruf

1954. 762 Seiten mit 460 Abbildungen, 223 Tabellen und 4 Farbtafeln.
In widerstandsfähigem Kunststoffeinband DM 49.80.

Um den enormen Fortschritten und der verbesserten Arbeitsweise in der Chemischen Technik gerecht zu werden, wurde der **Umfang der neuen Auflage um rund ein Viertel erweitert.** Selbstverständlich bedingte die Anpassung des Gesamtwerkes an den **neuesten Stand der Technik** starke Änderungen des Textes, wobei jedoch an der bisherigen, bewährten Gliederung festgehalten wurde.
So wird der «Henglein» auch weiterhin das auf der Höhe der Zeit stehende Übersichts- und Nachschlagewerk der Chemischen Technik sein.

Besonders zu beachten:

Entsprechend der Umfangserweiterung wurde das Sachregister auf über 6000 Stichworte erweitert.
Die Literatur der letzten 5 Jahre wurde möglichst vollständig erfasst (über 2000 Literaturzitate!).
Fast alle Abbildungen wurden durch neue ersetzt.
4 Farbtafeln und 160 Abbildungen wurden neu aufgenommen.
Zahlreiche tabellarische Übersichten sind neu hinzugekommen.
Durchweg Kunstdruckpapier, deshalb vorzügliche Wiedergabe von Text und Bildern.
Neuartiger, besonders widerstandsfähiger Einband (Kunststoff-Folie).

Ausführlicher Prospekt auf Wunsch

VERLAG CHEMIE · GMBH · WEINHEIM / BERGSTRASSE